

TUMSAT-OACIS Repository - Tokyo

University of Marine Science and Technology

(東京海洋大学)

クルマエビ類と微生物叢の関係に関する基礎的研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2022-06-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 今泉, 健太郎 メールアドレス: 所属:
URL	https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/2467

博士学位論文要約

クルマエビ類と微生物叢の関係に関する基礎的研究

2021 年度

(2022 年 3 月)

東京海洋大学大学院

海洋科学技術研究科

応用生命科学専攻

今泉 健太郎

第一章 序論

1. クルマエビ類養殖について

クルマエビ科に属するエビ類は世界で最も盛んに養殖されている甲殻類である。FAO の統計 (FAO, 2021) によれば、2019 年における世界の水産養殖生産量は 1 億 2000 万トンであり、このうちの約 5% をクルマエビ類が占めている (Fig. 1A および C)。生産額で見ると、約 2700 億ドルの水産養殖生産額の 15% にあたる 400 億ドルをクルマエビ類が占めている (Fig. 1B および D)。世界人口が増加し続けるなかで、動物性タンパク質の安定的な供給を達成するために水産養殖業は重要な存在であり、クルマエビ類は一定の役割を果たしている。また、単価の高いクルマエビ類などの海水性ないし汽水性のエビ類の養殖生産は、発展途上国における外貨獲得の手段としても重要である (FAO, 2020)。

クルマエビ類の主な養殖対象種としては、バナメイエビ *Litopenaeus vannamei*、ウシエビ *Penaeus monodon* およびクルマエビ *Marsupenaeus japonicus* などが挙げられる。このほかに、バナナエビ *Fenneropenaeus merguensis*、コウライエビ *Fenneropenaeus chinensis* およびテンジククルマエビ *Fenneropenaeus indicus* 等が世界各地で養殖されている。2000 年代初頭まではウシエビが最も多く養殖されていた。その後、養殖対象は急速にバナメイエビへと転換されていった (Lebel et al., 2010; Thitamadee et al., 2016)。バナメイエビは、中国、インド、東南アジアおよび南北アメリカを中心に世界中で養殖されており、2018 年には全世界の甲殻類生産量の半数を占めるに至った (FAO, 2020)。日本国内では沖縄県や西日本各地でクルマエビが養殖されているほか、近年は陸上養殖施設を使用したバナメイエビ養殖も行われ

ている。

親エビを飼育下で産卵させ、稚エビを大量生産し、配合飼料によって育てるとい
うクルマエビの完全養殖技術を 1930 年代に完成させたのが藤永元作博士である
(村井、1988)。藤永博士の確立した日本のクルマエビ養殖技術が東アジアにおけ
るウシエビ養殖の発展へとつながっていった。

クルマエビ養殖は、海岸付近に造成した人工池に底砂を敷き、海水を引き込んで
稚エビを放つことによって行われる。従来は、外洋側に水門を設置し潮位の干満に
よって自然に換水されるように設計されたが、近年ではポンプを使用して換水を行
うのが一般的である。養殖池の水はプランクトンによって緑色や褐色に着色し、視
界はしばしば数十 cm 以下となる。このため、定期的な潜水による観察が必要とな
る。また、各池の個体数の把握は坪刈りによって行われる。これは、複数の方形枠
を池に沈め、枠内のクルマエビを計数し、この時の尾数と池面積から池全体の個体
数を推定する手法である。生育したクルマエビは夜行性のため、給餌は主に夕方か
ら夜間に行われる。稚エビについては日中の給餌も行われる。収穫は主に網かごによ
って行われ、収穫されたクルマエビは冷海水にて鎮静化されたのち、おがくずやプ
ラスチックシートに埋め込んで活の状態出荷される。近年では急速冷凍による保
存も行われているようである。東京都中央卸売市場日報 (<https://www.shijou-nippo.metro.tokyo.lg.jp/>) によれば、2021 年 12 月の豊洲市場における養殖クルマエ
ビの相場は 1 kg あたり高値で 13,000 円前後、安値で 4,000 円前後となっており、
水産養殖産物としては非常に高価となっている。

バナメイエビ養殖は、人工的に造成した養殖池で行われる (Fig. 2A, B, C および

D)。東南アジアにおける近代的なバナメイエビ養殖場では、素掘りの池の底面に黒色のビニールシートを敷設する。このビニールシートは、池の中央から縁まで底面全体を覆っているだけでなく、縁から垂直に 10 cm ほど反り立つように設置される。これによって、周囲の環境に生息する野生の甲殻類等が池に侵入するのを防いでいる。また、防鳥ネットを設置して野鳥の侵入を防いでいる。小型の水車が池全体に分散設置され、これらが稼働することで曝気がなされる。池の中央付近から排水とともに沈殿した脱皮殻やエビの死体および残餌が排出されるセントラルドレーン方式が使用される。各池に一つないし複数の栈橋が設置され、池の中央付近まで渡ることが可能となっている。栈橋から四手網を降ろし、エビを掬い上げることで摂餌状況や病変の有無を確認する。遊泳生活を行うバナメイエビでは、ウシエビやクルマエビと比較して高密度での飼育が可能となる。

2. クルマエビ類の感染症について

世界の水産養殖業のなかで、クルマエビ類養殖は最も深刻な感染症被害を受けてきた産業の一つである (Subasinghe et al., 2019)。ウイルス、細菌、菌類および寄生虫といった多様な病原体がエビの感染症を引き起こす。ウシエビからバナメイエビへ養殖対象種が転換された理由の一つとして、Specific pathogen free (SPF) バナメイエビ種苗の確立が挙げられるが、依然として感染症の脅威は残っている (Thitamadee et al., 2016)。世界のクルマエビ類養殖では、ホワイトスポットシンドロームウイルス (WSSV) によって引き起こされるホワイトスポット病 (WSD)、イエローヘッドウイルスによって引き起こされるイエローヘッド病、微胞子虫

Enterocytozoon hepatopenaei (EHP) 感染、急性肝膵臓壊死病 (AHPND) および従来の各種ビブリオ属細菌感染症といった感染症が発生している (Saulnier et al., 2000; Thitamadee et al., 2016)。こういった感染症を引き起こす病原微生物は、稚エビや餌料となる環形動物の国際的な取引に伴って伝播していくと考えられる (Vijayan et al., 2005; Walker & Mohan, 2009; Krishnan et al., 2021)。しかしながら、世界各地の養殖対象生物とその取引および疾患発生を追跡する十分なデータが存在しないため、世界の水産養殖業における感染症発生の予測と制御は未だ困難である (Naylor et al., 2021)。

養殖池における病気の発生には、エビ、病原体および環境といった様々な要因が関連している (Snieszko, 1974; Flegel, 2019)。また、エビであれば種、栄養状態、家系といった要素が含まれるように、各要素についてさらに細かく考えることもできる。同様に、病原体であっても毒性や感染性の強弱や環境要因については水質や水温といった要素が含まれる。すなわち、単に特定の病原体が存在するからといって直ちに感染爆発が起こるわけではない。これらの要素を包括的に理解することによって、持続可能なクルマエビ養殖が達成される (Flegel, 2019)。

3. クルマエビ類の細菌感染症について

クルマエビ類の感染症は多様な病原微生物や寄生虫によって引き起こされうるが、本項では特に細菌感染症について述べる。クルマエビ類における病原細菌の多くは、通常の養殖環境中に存在するものである。すなわち、クルマエビ類の細菌感染症の大半は、それらの常在細菌が種々の要因によって感染を生じる日和見感染症

である (Aguirre-Guzmán et al., 2001)。したがって、養殖環境を適切に保つことが細菌感染症を防ぐうえで最も肝要である。

ビブリオ属細菌によって引き起こされる細菌感染症は、日本国内および諸外国のクルマエビ類養殖に被害を及ぼしている。日本国内のクルマエビ養殖の黎明期より、*Vibrio alginolyticus*、*Vibrio anguillarum* および *Vibrio parahaemolyticus* などが病エビより分離されてきた (高橋ら、1985; 桃山・室賀、2005)。これらに加えて、1982年に分離され、1995年に新種記載された *Vibrio penaeicida* はクルマエビに対して高い病原性を示すことが報告されている (Ishimaru et al., 1995)。諸外国においても、これらのビブリオ属細菌に加えて *Vibrio harveyi* 等が病原細菌として分離されている (Aguirre-Guzmán et al., 2001)。これらのビブリオ属細菌による感染症発生メカニズムの詳細は未解明であるが、エビの移動、飼育密度の増加、台風等の気象状況による水質変化、高水温などの状況下で発生することから、エビの生体防御能を低下させるストレス要因が発病を誘引するものとされる。*V. penaeicida* については、その主要な感染経路は経口的と考えられており (桃山・室賀、2005)、クルマエビに対する *V. penaeicida* の実験感染と細菌の分離培養をもとにした研究では、消化管内に侵入した *V. penaeicida* は胃で増殖し、これに続いて肝臓およびリンパ様器官に侵入することが示されている (de la Peña et al., 1995)。なお、夏季のクルマエビ養殖場にて発生する日中でも潜砂せずにふらふらと漂う異常個体の胃内は、通常個体と比較して、ビブリオ属細菌の占める割合が著しく高い (今泉、未発表データ)。ビブリオ属細菌による感染が進行すると、最終的には全身感染や菌血症のような状態になることもあるが (桃山・室賀、2005; Goarant et al., 2006; Soto-Rodriguez et al.,

2010)、感染初期においては消化管内での病原細菌の増殖が起こっているものと思われる。

特定の病原因子を有する細菌によって引き起こされる細菌感染症も存在する。急性肝膵臓壊死病 (Acute hepatopancreas necrosis disease; AHPND) は二つの毒素遺伝子、すなわち PirA および PirB をコードしたプラスミドを有する細菌によって引き起こされる (Lee et al., 2015)。この毒素遺伝子は、*Photorhabdus* 属細菌の産生する殺昆虫タンパク質 (*Photorhabdus* insect-related (Pir) binary toxin) に類似している。また、Lee ら (2015) が推定した *V. parahemolyticus* 由来の PirA および PirB 毒素タンパク質のヘテロ二量体立体構造は、*Bacillus thuringiensis* 由来の殺昆虫タンパク質 Cry 毒素に類似している。AHPND では感染した細菌によって産生される PirAB 毒素によって肝膵臓が損傷され、エビの斃死が引き起こされるものと考えられる。

AHPND の原因細菌として分離されているものの多くはビブリオ属細菌であり、Tran ら (2013) による原因細菌の特定以降、*V. parahaemolyticus* によるものが主である (Kumar et al., 2020)。Tran ら (2013) は病エビの胃から細菌を分離しており、AHPND を引き起こす *V. parahaemolyticus* は経口感染すると考えられている。後年の研究もこれを支持しており、AHPND の原因細菌は、エビの消化管へ経口的に侵入したのち、胃内で増殖し毒素を産生するとともに肝膵臓へ侵入するとされている (Lai et al., 2015)。近年の網羅的な細菌叢解析によっても、AHPND 発生時の病エビの胃におけるビブリオ属細菌の相対割合の顕著な増加が確認されている (Chen et al., 2017; Restrepo et al., 2021)。

AHPND の発生は 2009 年の中国に起因するとされる (Nunan et al., 2014)。その

後、ベトナム (Tran et al., 2013)、マレーシア (FAO, 2013)、タイ (Flegel, 2012)、メキシコ (Nunan et al., 2014)、フィリピン (de la Peña et al., 2015)、バングラデシュ (Eshik et al., 2017)、アメリカ (Dhar et al., 2019) および韓国 (Han et al., 2020) などでの発生が確認されている。

AHPND は日本未侵入とされてきたが、2020 年と 2021 年には沖縄県⁽¹⁾および広島県⁽²⁾のバナメイエビ養殖施設における発生が確認されている。現時点で明らかになっている限りでは、沖縄県における AHPND の発生は、海外から輸入した稚エビとともに持ち込まれた病原細菌によって引き起こされた可能性が高い⁽³⁾。したがって、現時点では日本の沿岸環境に AHPND 原因株が存在するとは考え難い。しかしながら、AHPND を引き起こす *V. parahaemolyticus* は、クルマエビにも実験感染が成立するため (Tinwongger et al., 2016)、今後の動向を注視していく必要がある。

注釈⁽¹⁾ 沖縄県 HP「県内バナメイエビ養殖場における急性肝臓壊死症(AHPND)

の発生について (<https://www.pref.okinawa.jp/site/norin/suisan/ahpnd.html>)」

(最終閲覧日 2022 年 2 月 9 日)

⁽²⁾ 中国新聞デジタル 2021 年 3 月 2 日「エビ壊死症、呉の養殖場で発生 国

内 2 例目、16 万匹被害 ([https://www.chugoku-](https://www.chugoku-np.co.jp/local/news/article.php?comment_id=731511&comment_sub_id=0&category_id=256)

[np.co.jp/local/news/article.php?comment_id=731511&comment_sub_id=0&ca](https://www.chugoku-np.co.jp/local/news/article.php?comment_id=731511&comment_sub_id=0&category_id=256)

[tegrory_id=256](https://www.chugoku-np.co.jp/local/news/article.php?comment_id=731511&comment_sub_id=0&category_id=256))」(最終閲覧日 2022 年 2 月 9 日)

⁽³⁾ 農林水産省、第 2 回 AHPND 防疫専門家会議

(https://www.maff.go.jp/j/press/syouan/tikusui/201023_12.html)

(最終閲覧日 2022 年 2 月 9 日)

4. クルマエビ類養殖における感染症防除法について

クルマエビ類養殖では、養殖環境に特定の病原体を持ち込まないことが有効な感染症対策となる。このため、親エビの選別と SPF 種苗の使用や飼育水の消毒技術が研究されている。しかしながら、換水時の病原体侵入や日和見感染を引き起こす常在細菌を完全に排除することは事実上不可能である。したがって、抗生物質などの薬剤の使用によって病原微生物を排除することや餌料添加物によってエビの免疫系あるいは飼育環境に影響を与えることで感染症に対応する。ただし、抗生物質および合成抗菌剤を含む抗菌剤の使用は、薬剤耐性菌の発生を誘引する。このため、抗菌剤の使用は厳しく制限されているが、養殖環境や水産物から多数の薬剤耐性菌が検出されている (Schar et al., 2021)。また、現在、日本国内ではクルマエビに対して使用が承認されている抗菌剤はない (農林水産省パンフレット「水産用医薬品について」(第 34 報))。本項では、クルマエビ類養殖において実施あるいは近年研究されている感染症防除技術について概説する。

対象生物の免疫系に働きかけてその機能を活性化させる物質が免疫賦活剤である。細菌の菌体を構成する成分であるペプチドグリカン (Itami et al., 1998) やリポポリサッカライド (Takahashi et al., 2000) はクルマエビ類に対して免疫賦活効果を示す。また、植物抽出物やアミノ酸および核酸類に関しても免疫賦活作用が報告されている (Dawood et al., 2018)。こういった水産分野における免疫賦活剤は、本来、ストレスなどの影響によって正常な働きを喪失した免疫系に影響を与え、免疫系の働きを正常に戻すことが目的である (酒井, 2013)。したがって、適切な使用を行わなければ効果は期待できない。特に、投与期間や投与量は重要であり、長期間に

わたる免疫賦活剤の連続的な使用は、かえってその効果を低減させる可能性がある (Sakai et al., 1999)。

対象生物に適切な量を投与することによってその生物の健康に有益な影響を及ぼす生きた微生物をプロバイオティクスと呼ぶ (FAO/WHO, 2001; FAO/WHO, 2002; Hill et al., 2014)。プロバイオティクスが水産生物の感染症に対する抗病性を向上させるメカニズムについては、菌体成分や細菌によって産生分泌される物質による免疫賦活効果や病原微生物の抑制、病原細菌との拮抗などの解釈が一般的である (Hoseinifar et al., 2018; Dawood et al., 2019)。プロバイオティクスとしては、培養が容易で芽胞の状態でも長期間保存することのできる *Bacillus* 属細菌が、ヒト、家畜、家禽、魚類および甲殻類や貝類を含む水産無脊椎動物に対して広く使用、または研究されている (Duc et al., 2004; Hong et al., 2005; Cutting, 2011; Mingmongkolchai & Panbangred, 2018; Kuebutornye et al., 2019)。*Bacillus* 属細菌によるプロバイオティクス効果のメカニズムの詳細については不明な点が多いが、マウスをモデルとした研究では、*Bacillus subtilis* の産生するフェンギシンによってクオラムセンシングが阻害されることで *Staphylococcus aureus* による感染が防がれる例が報告されている (Piewngam et al., 2018)。これに加えて、ヒト研究ではプロバイオティクスの及ぼす腸内細菌叢への影響も注目されている (Gareau et al., 2010; Gerritsen et al., 2011)。近年では水産生物においてもプロバイオティクスの投与による腸内細菌叢への影響が解析されているが、哺乳類とは異なる消化管システムを有するクルマエビ類においてどのような腸内細菌の状態が適切であるかは明らかでない。プロバイオティクスとして投与される外来の細菌が消化管に定着することは稀であり、投与方法や投

与量の検討は、プロバイオティクスの効果を向上させる意味でも重要となる。

5. 微生物叢解析について

エビの飼育環境中に存在する微生物群は、エビの成長や病気の発生と密接の関わる重要な要素であると考えられており、以前から調べられてきた (Burford, 1997; Moriarty, 1997; Páez-Osuna et al., 2003)。従来は、寒天培地を使用した細菌培養による養殖池の調査や、顕微鏡による大型プランクトンの観察によって、養殖池水中に存在する微生物群の調査が行われてきた。しかしながら、一般的な寒天培地上で培養可能な細菌は全体のごく少数であることや、検鏡によるプランクトンの種判別や計数は煩雑かつ熟練を要することから、養殖池水中の微生物組成の全体像を明らかにすることは困難であった。

近年では、次世代シーケンサー (Next generation sequencer; NGS) を使用した網羅的な微生物叢解析が一般的となっている。生物が普遍的に有するリボソーマル RNA 遺伝子、特に 16S rRNA 遺伝子 (16S rDNA) ないし 18S rRNA 遺伝子 (18S rDNA) を解析することで、試料中の微生物組成を推定することが可能となった。NGS の登場以前は、リボソーマル RNA 遺伝子の PCR 増幅産物をクローン化し配列決定を行う手法 (Wang et al., 2014) や、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (Denaturing gradient gel electrophoresis; DGGE) (Rungrassamee et al., 2013) によって、クルマエビ類とその養殖環境の微生物叢が解析されてきた。いずれも、NGS を使用した解析と比して解像度は著しく落ちる。例えば、イルミナ社 MiSeq を使用したシーケンシングを想定し、v2 の試薬セットを用いたとすると、1 回のシーケンシングラ

ンで約 1,000 万のシーケンスリード（ペアエンドリード）を生成することができる。仮に 100 サンプルを併せてライブラリーを作製したとしても、1 検体あたり約 10 万のシーケンスリードを得ることが可能である。

リボソーマル DNA の PCR アンプリコンを使用した微生物叢解析は、NGS を使用した解析であっても、他の従来的手法による解析であっても根本的な戦略は同じである。すなわち、検体から可能な限りバイアスのかからない手法で DNA を抽出・精製し、これをテンプレートとして PCR によって標的遺伝子配列を増幅し、配列決定を行う。得られた配列情報と、リボソーマル DNA 配列データベースから分類群を推定する。イルミナ社のプラットフォームを用いる場合は、一度目の PCR 後に PCR 産物の精製を行い、その後、検体を判別するためのバーコード配列 (Index) の付加と再度の精製を行う。これらを定量し、目的に応じて濃度を調整したうえで混和してライブラリーとしてシーケンシングを行う。得られた配列情報は公開されているソフトウェアを使用して解析することができる。このような PCR 増幅産物の配列決定に基づく微生物叢解析は、真核生物のゲノム配列や RNA-Seq データのアセンブリと比較して計算量が少なく済むため、汎用のパソコンを使用することもできる。

微生物叢解析において、しばしばメタゲノム解析という用語が使用される。従来は、NGS を使用した PCR 産物由来のライブラリーの配列決定とその解析もメタゲノム解析と呼称されていた。しかしながら、近年では、シーケンサーや計算機および解析ソフトウェアの性能の飛躍的な向上によって、多数の微生物種由来のゲノム DNA が混在したサンプルから多数のゲノム配列を再構築することや存在する遺伝

子の網羅的な解析を行うことが可能となってきている。したがって、後者について特にメタゲノム解析と呼称するほうがより適当であると思われる (Holt et al., 2021)。和文誌や和文の専門書では、リボソーマル RNA 遺伝子の PCR 増幅産物に基づく解析は、メタ 16S 解析やメタ 18S 解析といった呼称をされることがある (服部, 2014)。しかしながら、英文誌ではこの表現は一般的でない。そこで、本稿では、PCR 増幅産物に基づく微生物叢解析をメタゲノム解析とは呼称せず、単に微生物叢解析と呼称し、方法や結果あるいは考察の項にてそれが明らかに区別できるような記載をすることとした。

微生物叢の解析では、主に生物組成の棒グラフ、種々の多様性指数、主座標分析 (Principal coordinate analysis; PCoA) ないし主成分分析 (Principal component analysis; PCA) および linear discriminant analysis (LDA) Effect Size (LEfSe) などが使用される。近年では、これらに加えて細菌群の機能や、その機能に基づいた細菌群間のつながりを推定する解析も行われているが、エビ類を含む非モデル生物を取り巻く微生物群に対して、現状そういった解析にどの程度の信頼性があるかは明らかでない (Sun et al, 2020)。

生物組成の棒グラフは、一般的に、各試料から検出された微生物の分類群 (目レベル、科レベルないし属レベルなど) について全体を 100 とした相対検出頻度で表される。しかし、マーカー遺伝子のコピー数は生物種や細菌株によって異なり、各微生物の総量の絶対数を反映させることは困難である。これに伴い、異なる検体由来の解析結果を並べる際は、あくまで組成の特徴をつかむことを目的とし、対照群との比較や微生物集団の多様性といった指標も併せて吟味すべきである。

集団の多様性は大きく二つに分けて捉えられる。すなわち、 α 多様性と β 多様性である。 α 多様性は、一集団内の構成要素に基づく多様性を表す (Loreau, 2000)。最も単純な例は種数であり、これに検出頻度の偏り等を加味した種々の指数が考案されている。 β 多様性は、複数集団間の多様性を表す (Loreau, 2000; Mori et al., 2018)。

PCoA や PCA は生態学分野で以前より用いられてきた次元圧縮の手法である。細菌叢解析では、PCoA がより一般的に使用される。点の位置が近いほどサンプル間の配列の組成、すなわち微生物組成が類似していることを示す (Goodrich et al., 2014)。

LEfSe は、集団間の違いをもっともよく反映する特徴量 (微生物の分類群など) を統計的に検出する手法である (Segata et al., 2011)。この手法によって、特定の疾患を特徴づけるバイオマーカー候補の探索 (Suchodolski et al., 2015; Shoskes et al., 2016) や、実験的な介入の及ぼす細菌組成への影響の評価が行われている (Zhang et al., 2018)。

6. クルマエビ類と微生物叢について

飼育水中の細菌叢の形成は、確率論的な支配を受ける。Heyse ら (2021) がバナメイエビ種苗を飼育している水槽の細菌組成を経時的に解析したところ、異なる水槽間で形成される細菌組成が大きく異なった。これによれば、水槽における細菌叢の形成は、投入された餌料や換水時の水に含まれる細菌がある程度寄与することは明らかであるが、それ以上に、どういった細菌が増減するかといった点には不確実な要素が関与する。さらに、野外の養殖池では、飼育水中の微生物叢の形成過程や

その変動に関する網羅的な研究例は限られ、不明な点が多い。Zhan ら (2021) が屋外のバナメイエビ養殖池について解析した報告によれば、同一地点の異なる水深で採水し細菌組成を解析した結果は類似しており、水中の細菌は垂直方向に対して一様に分布していると考えられる。

エビの消化管に存在する細菌群についても、飼育環境中の細菌群と同様にエビの健康と密接に関わっていると考えられている。従来の分離培養に基づく研究から近年の NGS による解析まで一貫して、飼育水中の細菌組成とエビの消化管内に存在する細菌組成が大きく異なっていることが報告されており、クルマエビ類の消化管内に特徴的な細菌叢が形成されていることを示唆している (坂田・垂野、1987a; 坂田・垂野、1987b; Holt et al., 2021)。ただし、既報の研究の大半はエビの腸管の細菌組成を解析しており、消化管の他の部位について解析を行っている研究例は極めて少ない (Cornejo-Granados et al., 2018; Holt et al., 2021)。クルマエビのような潜砂する種では、底砂中に存在する細菌群の解析も行われており、底砂と飼育水中の細菌組成に関連が認められることとは対照的に、消化管内の細菌組成は、それら環境中のものとは異なる (Zhou et al., 2021)。クルマエビ類の消化管内では、特に *Photobacterium* 属細菌や *Vibrio* 属細菌といったビブリオ科の細菌が優占種となることが多い (Soonthornchai et al., 2015; Holt et al., 2021)。これについては、ウシエビにおける DGGE を使用した解析に基づいて、ポストラーバ期から稚エビに発達するに伴い優占種が *Photobacterium* 属細菌から *Vibrio* 属細菌へ変遷するという報告もある (Rungrassamee et al., 2013)。ただし、これが普遍的な現象であるかは不明である。また、これに加えて、近年の NGS を使用した解析では、クルマエビ類

の消化管に数%以上の相対的割合で存在する未分離の細菌が見つかった。特に、*Candidatus Bacilloplasma* (Kostanjsek et al., 2007) に近縁と考えられる Mollicutes 綱に属する細菌は、クルマエビ類と微生物叢における感染症発生との関連が示唆されている。

近年では、感染症の発生と消化管内の細菌叢の関連が論じられている。例えば、AHPND の発生と胃細菌叢および腸内細菌叢の関連が解析されており、AHPND に罹患したエビでは、その胃において *Vibrio* 属細菌の占める相対的な割合が高いことが報告されている (Chen et al., 2017; Restrepo et al., 2021)。これに加えて、Chen ら (2017) は病エビの胃において *Candidatus Bacilloplasma* の存在割合が高いことを報告している。ウイルス病では、ホワイトスポットシンドロームウイルス (WSSV) 感染後の腸内細菌叢が解析されている。WSSV に感染したエビでは *Photobacterium* 属、*Propionigenium* 属および *Arcobacter* 属に属する細菌が増加し、*Candidatus Bacilloplasma* および *Flavobacterium* 属の細菌が減少したことが報告されている (Wang et al., 2019)。このほかに、White feces syndrome (WFS) 発生の原因は単一の病原体ではなく、消化管内細菌叢の不調によるものとする報告がなされている (Huang et al., 2020)。これらのクルマエビ類の細菌叢と感染症発生の関連性に関する報告については、未だ不明な点が多い。すなわち、単に疾患発生の結果として細菌組成の変化がもたらされているのか、あるいは細菌叢の変化が感染症の発生を誘引するのかは定かではない。Huang ら (2020) による WFS に関する報告が正しいとすれば、クルマエビ類において消化管内細菌組成の変化が、直接、疾患を引き起こすという興味深い発見である。

7. 常在細菌の役割とその制御機構について

常在細菌が外来の細菌（特に病原細菌）の増殖を妨げる現象、すなわち定着抵抗性（Colonization resistance）は常在細菌によるバリア機構のメカニズムの一つと考えられている（Lawley and Walker, 2013）。また、常在細菌と宿主の関係が破綻することによる細菌叢異常（Dysbiosis）は、疾患発生の原因と考えられている（Levy et al., 2017）。ここでいう Colonization resistance や Dysbiosis という単語は本来、哺乳類、特にヒトの腸内細菌叢について用いられるものであったが、昨今の微生物叢研究の発展に伴い幅広い対象生物について適用されている。これに倣い、本稿でもクルマエビ類の体表や消化管内に存在する微生物群についてもこれらの用語を使用することとする。なお、Dysbiosis については、ヒト研究においても定義は未だ不明確である（Tiffany & Bäumlér, 2019）。

脊椎動物では胃液の強酸によって、口から侵入した細菌の大半が殺菌される。これにより、消化管内では肛門に近づくにつれて細菌の絶対数が増加する（Leser & Mølbak, 2009）。哺乳類では腸上皮の内腔側に形成されるムチンを含む粘液層に細菌が定着し、宿主との相互関係を通して宿主の消化吸收の働きや免疫系に多大な影響を及ぼしている（Leser & Mølbak, 2009）。

哺乳類の腸内細菌叢制御で重要な役割を担うのが分泌型の免疫グロブリン IgA である。IgA は抗原となる細菌を排除し、細菌の上皮細胞層への侵入を防いでいる（Brandtzaeg, 2007）。また、IgA は腸上皮粘膜層における特定の細菌の定着に寄与している（Huus et al., 2021）。近年では、魚類（ニジマス）の鰓細菌叢の制御に分泌型免疫グロブリン IgT が関与することが示されている（Xu et al., 2020）。脊椎動物

が進化していくうえで、分泌型抗体による粘膜組織の細菌叢制御機構が確立されていったと考えられる (Xu et al., 2020)。

クルマエビ類を含む甲殻類においては、体表の細菌叢を制御する機構に関して一般化された見識はない。近年では、クルマエビにおいて C 型レクチンが関与する腸管内細菌制御機構の存在が示唆されている (Zhang et al., 2021)。また、バナメイエビでは抗菌ペプチドであるクラスチンが鰓細菌叢制御に関与している可能性が示されている (Lv et al., 2020)。クルマエビ類は、ある程度の体サイズがあり、観察やハンドリングといった実験操作が比較的容易である。クルマエビ類を使用して水棲の無脊椎動物における体表の免疫システムと細菌叢制御機構を解明することは、生物の進化を考えるうえでも重要である。

8. クルマエビ類の消化管構造について

クルマエビ類の消化管は、組織学的・解剖学的に三つの部位に大別され、それぞれ役割も異なる (Bell & Lightner, 1988; Ceccaldi, 1989)。すなわち、前腸・胃 (Foregut・Stomach)、中腸 (Midgut) および後腸 (Hindgut) であり、これは昆虫類などの他の節足動物に類似する。中腸および後腸を併せて腸ないし腸管 (Intestine) と呼称する場合もある。これに加えて、胃から中腸につながる消化管部位を包み込むような形で中腸線・肝膵臓 (Hepatopancreas) が存在する。胃は頭胸部の前方に存在する袋状の臓器である。一般的に胃酸を有する脊椎動物と異なり、無脊椎動物の胃は強酸を分泌せず (Stumpp et al., 2015)、クルマエビ類においても強酸の胃液は存在しない (Navarrete del Toro et al., 2011)。中腸は食下された餌料由来の栄養分を吸収して

いると考えられ、後腸は水分の吸収に参与しているものと推測されている (Ceccaldi, 1989)。前腸および後腸にはクチクラが存在し、このクチクラは殻と同様に脱皮時に更新される (Ceccaldi, 1989)。これとは対照的に、中腸ではキチンを骨格とした薄膜、すなわち囲食膜 (Peritrophic matrix・Peritrophic membrane; PM) が形成される (Bell & Lightner, 1988; Martin et al., 2006; Wang et al., 2012)。

昆虫類の中腸では、囲食膜が消化管内容物を包み込み、これらが一体となって排泄されることが知られている。囲食膜は食下された病原体が腸上皮と直接接触することを防ぎ、体内への侵入を防ぐ物理的なバリア機構として存在すると考えられている (Kuraishi et al., 2011)。RNAi やキチン合成酵素阻害剤の投与によって昆虫の囲食膜の形成をかく乱すると、細菌やウイルスに対する感受性が高まることが報告されている (Erlandson et al., 2019)。したがって、害虫駆除を目的とした殺昆虫ウイルスや殺昆虫毒素の効果的な使用を目的として、研究されている (Erlandson et al., 2019)。

近年では、腸管でのキチン合成とそれによるバリア機構がより広範な生物種に存在することが示されている。Nakashima ら (2018) は、腸管におけるキチン合成と囲食膜によるバリア機構が頭索動物、尾索動物、脊椎動物の円口類および条鰭類に存在することを示した。同様に、甲殻類においてもキチンを含む膜構造によって消化管内容物と腸上皮が物理的に隔てられていることが改めて報告されている (Martin et al., 2020)。Nakashima ら (2018) が示したように、哺乳類の腸管粘膜層における腸内細菌の定着と宿主との相互関係の確立は、生物進化上、哺乳類が獲得した派生的な特徴である。

クルマエビ類においては、中腸におけるキチンを構成成分とする薄膜の存在が古くから知られていたにもかかわらず、その役割や形成メカニズムに関する研究は限られる。Wang ら (2012) は、電子顕微鏡画像をもとにバナメイエビの囿食膜を観察するとともに、これに含まれるタンパク質の解析を行っている。Thuong ら (2016) は、バナメイエビの口から PBS を流し込むことによって消化管内構造をかく乱し、WSSV による攻撃試験を行うことによって、囿食膜の役割について考察している。Martin ら (2020) は、組織学的手法によって複数種の甲殻類の囿食膜構造を観察しているが、クルマエビ類は扱っていない。

キチンは N-アセチルグルコサミンの重合体であり、多様な生物種がこれを生合成することが知られている。菌類の細胞壁や節足動物の外骨格がキチンを含有することは古くから知られているが、近年では、硬骨魚類や両生類、頭索動物、尾索動物および円口類においてもキチンが生合成されていることが示されている (Tang et al., 2015; Nakashima et al., 2018)。昆虫類では、キチンの生合成メカニズムが比較的詳細に調べられており、トレハロースを前駆体として、7種類程度の酵素が関与する修飾を経てウリジン二リン酸 N-アセチルグルコサミンが合成される (Liu et al., 2019)。さらに、キチン合成酵素によって重合がなされ、キチンとなる。加えて、一部の N-アセチルグルコサミン残基はグルコサミンへと変換される (Liu et al., 2019)。

クルマエビ類では、キチンの生合成に関して分子生物学的な詳細は明らかになっていない。Rocha ら (2012) は、バナメイエビのキチン合成酵素遺伝子ホモログの部分配列を決定し、組織別の発現解析と脱皮周期との関連を解析している。これに

加えて、Zhang ら (2019) はバナメイエビのゲノムと発現遺伝子を解析し、脱皮にともなう殻の再形成および囲食膜形成に関与する遺伝子群の存在を示唆している。

9. レクチンについて

生物が病原微生物などの非自己の排除を行うためには、まず、その非自己を認識する必要がある。病原体を認識するうえで重要となるのが病原体関連分子パターン (Pathogen-Associated Molecular Patterns: PAMPS) であり (Zindel & Kubes, 2020)、これを感知する役割を担うのがパターン認識受容体 (Pathogen Recognition Receptor: PRR) である (Kumagai & Akira, 2010)。細菌の LPS やペプチドグリカン、菌類の β -グルカンが代表的な PAMPS である。これら微生物由来の PAMPS は、しばしばその構成成分に糖鎖を含む。したがって、この糖鎖を認識する分子が PRR として機能する場合がある。

レクチンは糖鎖に結合するタンパク質の総称である。C 型レクチン、I 型レクチン、ガレクチンおよび P 型レクチンなどといったファミリーが存在し、それらの構造は全く異なる (Gabius, 1997)。レクチンは様々な生物種に広く分布しており、その機能も多様である (Turner, 1996)。病原微生物表面の糖鎖に結合するレクチンは、PAMPS を認識する PRR として機能している。特に、血球細胞や粘膜組織で発現しているレクチンは、生体防御を担う分子の一つとして重要であると考えられる。

C 型レクチンはカルシウムイオンを要求し、C 型レクチンドメインを有するレクチンである (Zelensky & Gready, 2005)。C 型レクチンは、結合する糖の種類に応じてさらに細かくサブファミリーに分類される。クルマエビ類では、マンノース、マ

ルトース、トレハロース、N-アセチルグルコサミン、LPS、PGNなどに結合するC型レクチンが報告されている (Sun et al., 2008; Wang et al., 2009; Zhang et al., 2009)。これらクルマエビ類のC型レクチンは、他の生物種におけるそれと同様に細菌および真菌を凝集させ、殺菌あるいは抗菌活性を示すことがある (Lai et al., 2013)。また、ウイルス感染に応答して発現量が増加するC型レクチンも報告されており、それらは、ウイルスに対する免疫系の情報伝達に関与していると考えられる。

Alenton ら (2017) によって発見されたクルマエビのエラおよび胃で発現するC型レクチン、MjGCTL はグルコース、キシロースおよびN-アセチル-D-グルコサミンといった糖やLPSおよびPGNに結合し、グラム陽性およびグラム陰性の細菌を凝集させる働きを示す。RNAiによってMjGCTLをノックダウンすると、クルマエビの *V. parahaemolyticus* に対する感受性が増加することが報告されており、MjGCTL はクルマエビの粘膜組織における免疫系を担う分子の一つとして重要な働きを有するものと考えられる (Alenton et al., 2019)。

10. RNAi について

生物の持つウイルスに対抗する免疫系の働きを利用して標的となる遺伝子転写産物を自ら破壊させることによって遺伝子発現を阻害する手法がRNA干渉 (RNA interference: RNAi) である。無脊椎動物では、長鎖の二本鎖RNAを投与してRNAiを行うことが多く、アンチセンス鎖の一本鎖RNAによる遺伝子発現阻害 (Fire et al., 1991) と比較して阻害効果が大きい (Fire et al., 1998)。これは、Dicer と呼ばれる酵素によって二本鎖RNAが切断され、RNA-induced silencing complex (RISC) と

呼ばれるタンパク質複合体を形成しこれを再利用しながら配列特異的に mRNA を分解するメカニズムが存在するためである (Khvorova et al., 2003)。RNAi による遺伝子発現阻害は、原理的に完全に転写産物を排除できないため、遺伝子欠損による遺伝子ノックアウトに対して遺伝子ノックダウンと呼ばれる。

RNAi の成否は、投与された二本鎖 RNA が標的となる遺伝子を発現している細胞に取り込まれるか否かにかかる。加えて、生物種によって RNAi の可否が異なる。例えば、ショウジョウバエの成虫では二本鎖 RNA 投与による RNAi は困難とされる (Huvenne & Smaghe, 2010)。ただし、S2 などの培養細胞では外来二本鎖 RNA による RNAi が成功する場合がある (Saleh et al., 2006)。これとは対照的に、生物種によっては二本鎖 RNA の経口投与による RNAi が可能である場合がある (Chikami et al., 2021)。

クルマエビ類では、一般的に、注射による二本鎖 RNA の投与が行われ、標的遺伝子の役割が推測される。特に、免疫関連遺伝子を標的とした RNAi によって免疫系の働きが解明されてきた。例えば、クルマエビのトランスグルタミナーゼ(TGase) やクロッティングタンパク質を RNAi によってノックダウンすると、血リンパの凝固が生じなくなることが報告されている (Maningas et al., 2008)。

前述のとおり、二本鎖 RNA の接種による遺伝子ノックダウンは生物がウイルスに対抗するための仕組みを利用している。したがって、外来二本鎖 RNA の接種は種々の抗ウイルス応答を引き起こすと考えられる。実際に、外来の二本鎖 RNA をバナメイエビに接種すると WSSV およびタウラ症候群原因ウイルス (TSV) 感染による斃死が低減される (Robalino et al., 2004)。また、この現象はウイルス遺伝子配

列に依存して増強される (Robalino et al., 2005)。このため、RNAi 実験時の実験デザインには慎重を期する必要がある。

11. 本研究の目的

本研究は、クルマエビ類の消化管および養殖池水の微生物叢の特性を明らかにし、また、クルマエビ類の消化管構造を解析し、さらにクルマエビ類の粘膜組織における細菌叢制御メカニズムの一端を解明することを目的とする。第二章では、バナメイエビおよびクルマエビの胃および中腸の細菌叢を解析する。第三章では、タイ国のバナメイエビ養殖場にて、池水の細菌叢と真核微生物叢およびエビ消化管の細菌叢を解析する。第四章では、クルマエビの腸管構造についてキチン合成酵素と囲食膜に着目して解析を行う。第五章では、クルマエビの粘膜組織で発現する C 型レクチンと細菌叢制御の関連について解析を行う。

引用文献

- Aguirre-Guzmán, G., Vázquez-Juárez, R., & Ascencio, F. (2001). Differences in the susceptibility of American white shrimp larval substages (*Litopenaeus vannamei*) to four *Vibrio* species. *Journal of Invertebrate Pathology*, 78, 215-219.
- Alenton, R. R. R., Koiwai, K., Miyaguchi, K., Kondo, H., & Hirono, I. (2017). Pathogen recognition of a novel C-type lectin from *Marsupenaeus japonicus* reveals the divergent sugar-binding specificity of QAP motif. *Scientific Reports*, 7, 45818.
- Alenton, R. R. R., Koiwai, K., Nakamura, R., Thawonsuwan, J., Kondo, H., & Hirono, I. (2019). A hint of primitive mucosal immunity in shrimp through *Marsupenaeus japonicus* gill C-type lectin. *The Journal of Immunology*, 203, 2310-2318.
- Bell, T. A., & Lightner, D. V. (1988). *A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.
- Brandtzaeg, P. (2007). Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. *Vaccine*, 25, 5467-5484.
- Burford, M. (1997). Phytoplankton dynamics in shrimp ponds. *Aquaculture Research*, 28, 351-360.
- Ceccaldi, H. J. (1989) Anatomy and physiology of digestive tract of Crustaceans Decapods reared in aquaculture. *Advances in Tropical Aquaculture, Workshop at Tahiti, French Polynesia, 20 Feb-4 Mar 1989.*, 9 243–259.
- Chen, W. Y., Ng, T. H., Wu, J. H., Chen, J. W., & Wang, H. C. (2017). Microbiome dynamics in a shrimp grow-out pond with possible outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease. *Scientific Reports*, 7, 9395.
- Chikami, Y., Kawaguchi, H., Suzuki, T., Yoshioka, H., Sato, Y., Yaginuma, T., & Niimi, T. (2021). Oral RNAi of *diapl* results in rapid reduction of damage to potatoes in

- Henosepilachna vigintioctopunctata*. Journal of Pest Science, 94, 505-515.
- Cornejo-Granados, F., Gallardo-Becerra, L., Leonardo-Reza, M., Ochoa-Romo, J. P., & Ochoa-Leyva, A. (2018). A meta-analysis reveals the environmental and host factors shaping the structure and function of the shrimp microbiota. PeerJ, 6, e5382.
- Cutting, S. M. (2011). *Bacillus* probiotics. Food Microbiology, 28, 214-220.
- Dawood, M. A. O., Koshio, S., & Esteban, M. Á. (2018). Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review. Reviews in Aquaculture, 10, 950-974.
- Dawood, M. A. O., Koshio, S., Abdel-Daim, M. M., & Doan, H. V. (2019). Probiotic application for sustainable aquaculture. Reviews in Aquaculture, 11, 907-924.
- de la Peña L. D., Nakai, T., & Muroga, K. (1995). Dynamics of *Vibrio* sp. PJ in organs of orally infected kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. Fish Pathology, 30, 39-45.
- de la Peña L. D., Cabillon, N. A. R., Catedral, D. D., Amar, E. C., Usero, R. C., Monotilla, W. D., Calpe, A. T., Fernandez, D. D. G., & Saloma, C. P. (2015). Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) outbreaks in *Penaeus vannamei* and *P. monodon* cultured in the Philippines. Diseases of Aquatic Organisms, 116, 251-254.
- Dhar, A. K., Piamsomboon, P., Caro, L. F. A., Kanrar, S., Adami Jr, R., & Juan, Y. S. (2019). First report of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) occurring in the USA. Diseases of Aquatic Organisms, 132, 241-247.
- Duc, L. H., Hong, H. A., Barbosa, T. M., Henriques, A. O., & Cutting, S. M. (2004). Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. Applied and Environmental Microbiology, 70, 2161-2171.
- Erlandson, M. A., Toprak, U., & Hegedus, D. D. (2019). Role of the peritrophic matrix in insect-pathogen interactions. Journal of Insect Physiology, 117, 103894.
- Eshik, M. M. E., Abedin, M. M., Punom, N. J., Begum, M. K., & Rahman, M. S. (2017). Molecular identification of AHPND positive *Vibrio parahaemolyticus* causing an

- outbreak in south-west shrimp farming regions of Bangladesh. *Journal of Bangladesh Academy of Sciences*, 41, 127-135.
- FAO/WHO. (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, Argentina.
- FAO/WHO. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London Ontario, Canada.
- FAO (Fisheries and Aquaculture Organization of the United Nations (2013) Report of the FAO/MARD technical workshop on early mortality syndrome (EMS) or acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS) of cultured shrimp (under TCP/VIE/3304), Hanoi, Vietnam, 25–27 June 2013. FAO Fish Aquacult Rep 1053. FAO, Rome.
- FAO, 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020- Sustainability in Action. Rome, 10.4060/ca9229en
- FAO. (2021). Fisheries and Aquaculture, Statistical Query Panel, Global aquaculture production. (<https://www.fao.org/fishery/statistics-query/en/aquaculture>)
- Fire, A., Albertson, D., Harrison, S. W., & Moerman, D. G. (1991). Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle. *Development*, 113, 503-514.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, 806-811.
- Flegel, T. W. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in

- Asia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110, 166-173.
- Flegel, T. W. (2019). A future vision for disease control in shrimp aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society*, 50, 249-266.
- Gabius, H. J. (1997). Animal lectins. *European Journal of Biochemistry*, 243, 543-576.
- Gareau, M. G., Sherman, P. M., & Walker, W. A. (2010). Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 7, 503-514.
- Gerritsen, J., Smidt, H., Rijkers, G. T., & de Vos, W. M. (2011). Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. *Genes & Nutrition*, 6, 209-240.
- Goarant, C., Ansquer, D., Herlin, J., Domalain, D., Imbert, F., & De Decker, S. (2006). “Summer syndrome” in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia: Pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*. *Aquaculture*, 253, 105-113.
- Goodrich, J. K., Di Rienzi, S. C., Poole, A. C., Koren, O., Walters, W. A., Caporaso, J. G., Knight, R., & Ley, R. E. (2014). Conducting a microbiome study. *Cell*, 158, 250-262.
- Han, J. E., Choi, S. K., Han, S. H., Lee, S. C., Jeon, H. J., Lee, C., Kim, K. Y., Lee, Y. S., Park, S. C., Rhee, G., Park, S. Y., Kim, J.-S., Park, S., Kim, J. H., & Lee, K. J. (2020). Genomic and histopathological characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from an acute hepatopancreatic necrosis disease outbreak in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) cultured in Korea. *Aquaculture*, 524, 735284.
- 服部正平. (2014). ヒト腸内マイクロバイオーーム解析のための最新技術. *日本臨床免疫学会会誌*, 37, 412-422.
- Heyse, J., Props, R., Kongnuan, P., De Schryver, P., Rombaut, G., Defoirdt, T., & Boon, N. (2021). Rearing water microbiomes in white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

- larviculture assemble stochastically and are influenced by the microbiomes of live feed products. *Environmental Microbiology*, 23, 281-298.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11, 506-514.
- Holt, C. C., Bass, D., Stentiford, G. D., & van der Giezen, M. (2021). Understanding the role of the shrimp gut microbiome in health and disease. *Journal of Invertebrate Pathology*, 186, 107387.
- Hong, H. A., Duc, L. H., & Cutting, S. M. (2005). The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 813-835.
- Hoseinifar, S. H., Sun, Y. Z., Wang, A., & Zhou, Z. (2018). Probiotics as means of diseases control in aquaculture, a review of current knowledge and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2429.
- Huang, Z., Zeng, S., Xiong, J., Hou, D., Zhou, R., Xing, C., Wei, D., Deng, X., Yu, L., Wang, H., Deng, Z., Weng, S., Kriengkrai, S., Ning, D., Zhou, J., & He, J. (2020). Microecological Koch's postulates reveal that intestinal microbiota dysbiosis contributes to shrimp white feces syndrome. *Microbiome*, 8, 32.
- Huus, K. E., Petersen, C., & Finlay, B. B. (2021). Diversity and dynamism of IgA-microbiota interactions. *Nature Reviews Immunology*, 21, 514-525.
- Huvenne, H., & Smagghe, G. (2010). Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review. *Journal of Insect Physiology*, 56, 227-235.
- Ishimaru, K., Akagawa-Matsushita, M., & Muroga, K. (1995). *Vibrio penaeicida* sp. nov., a pathogen of kuruma prawns (*Penaeus japonicus*). *International Journal of Systematic*

- and Evolutionary Microbiology, 45, 134-138.
- Itami, T., Asano, M., Tokushige, K., Kubono, K., Nakagawa, A., Takeno, N., Nishimura, H., Maeda, M., Kondo, M., & Takahashi, Y. (1998). Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Aquaculture*, 164, 277-288.
- Khvorova, A., Reynolds, A., & Jayasena, S. D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, 115, 209-216.
- Kostanjsek, R., Strus, J., & Avgustin, G. (2007). “*Candidatus* Bacilloplasma,” a novel lineage of Mollicutes associated with the hindgut wall of the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 5566-5573.
- Krishnan, A. N., Kannappan, S., Aneesh, P. T., Praveena, P. E., & Jithendran, K. P. (2021). Polychaete worm - A passive carrier for *Enterocytozoon hepatopenaei* in shrimp. *Aquaculture*, 545, 737187.
- Kumagai, Y., & Akira, S. (2010). Identification and functions of pattern-recognition receptors. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125, 985-992.
- Kumar, R., Ng, T. H., & Wang, H. C. (2020). Acute hepatopancreatic necrosis disease in penaeid shrimp. *Reviews in Aquaculture*, 12, 1867-1880.
- Kuebutornye, F. K., Abarike, E. D., & Lu, Y. (2019). A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology*, 87, 820-828.
- Kuraishi, T., Binggeli, O., Opota, O., Buchon, N., & Lemaitre, B. (2011). Genetic evidence for a protective role of the peritrophic matrix against intestinal bacterial infection in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 15966-15971.
- Lai, H. C., Ng, T. H., Ando, M., Lee, C. T., Chen, I. T., Chuang, J. C., Mavichak, R., Chang,

- S. H., Yeh, M. D., Chiang, Y. A., Takeyama, H., Hamaguchi, H., Lo, C. F., Aoki, T., & Wang, H. C. (2015). Pathogenesis of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *Fish & Shellfish Immunology*, 47, 1006-1014.
- Lai, X., Kong, J., Wang, Q., Wang, W., & Meng, X. (2013). Identification and molecular characterization of a C-type lectin-like protein from Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). *Molecular Biology Reports*, 40, 2223-2230.
- Lawley, T. D., & Walker, A. W. (2013). Intestinal colonization resistance. *Immunology*, 138, 1-11.
- Lebel, L., Mungkung, R., Gheewala, S. H., & Lebel, P. (2010). Innovation cycles, niches and sustainability in the shrimp aquaculture industry in Thailand. *Environmental Science & Policy*, 13, 291-302.
- Lee, C. T., Chen, I. T., Yang, Y. T., Ko, T. P., Huang, Y. T., Huang, J. Y., Huang, M. F., Lin, S. J., Chen, C. Y., Lin, S. S., Lightner, D. V., Wang, H. C., Wang, A. H. J., Wang, H. C., Hor, H. I., & Lo, C. F. (2015). The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, 10798-10803.
- Leser, T. D., & Mølbak, L. (2009). Better living through microbial action: the benefits of the mammalian gastrointestinal microbiota on the host. *Environmental Microbiology*, 11, 2194-2206.
- Levy, M., Kolodziejczyk, A. A., Thaïss, C. A., & Elinav, E. (2017). Dysbiosis and the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 17, 219-232.
- Liu, X., Cooper, A. M., Zhang, J., & Zhu, K. Y. (2019). Biosynthesis, modifications and degradation of chitin in the formation and turnover of peritrophic matrix in insects. *Journal of Insect Physiology*, 114, 109-115.
- Loreau, M. (2000). Are communities saturated? On the relationship between α , β and γ

- diversity. *Ecology Letters*, 3, 73-76.
- LV, X., Li, S., Yu, Y., Zhang, X., & Li, F. (2020). Characterization of a gill-abundant crustin with microbiota modulating function in *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 105, 393-404.
- Maningas, M. B. B., Kondo, H., Hirono, I., Saito-Taki, T., & Aoki, T. (2008). Essential function of transglutaminase and clotting protein in shrimp immunity. *Molecular Immunology*, 45, 1269-1275.
- Martin, G. G., Simcox, R., Nguyen, A., & Chilingaryan, A. (2006). Peritrophic membrane of the penaeid shrimp *Sicyonia ingentis*: structure, formation, and permeability. *The Biological Bulletin*, 211, 275-285.
- Martin, G. G., Natha, Z., Henderson, N., Bang, S., Hendry, H., & Loera, Y. (2020). Absence of a microbiome in the midgut trunk of six representative Crustacea. *Journal of Crustacean Biology*, 40, 122-130.
- Mingmongkolchai, S., & Panbangred, W. (2018). *Bacillus* probiotics: an alternative to antibiotics for livestock production. *Journal of Applied Microbiology*, 124, 1334-1346.
- 桃山和夫・室賀清邦 (2005). 日本の養殖クルマエビにおける病害問題. *魚病研究*, 40, 1-14.
- Mori, A. S., Isbell, F., & Seidl, R. (2018). β -diversity, community assembly, and ecosystem functioning. *Trends in Ecology & Evolution*, 33, 549-564.
- Moriarty, D. J. (1997). The role of microorganisms in aquaculture ponds. *Aquaculture*, 151, 333-349.
- 村井吉敬. (1988). エビと日本人. 岩波書店. 東京.
- Nakashima, K., Kimura, S., Ogawa, Y., Watanabe, S., Soma, S., Kaneko, T., Yamada, L.,

- Sawada, H., Tung, C.-H., Lu, T.-M., Yu, J.-K., Villar-Briones, A., Kikuchi, S., & Satoh, N. (2018). Chitin-based barrier immunity and its loss predated mucus-colonization by indigenous gut microbiota. *Nature Communications*, 9, 3402.
- Navarrete del Toro, M. A., García-Carreño, F. L., & Córdova-Murueta, J. H. (2011). Comparison of digestive proteinases in three penaeids. *Aquaculture*, 317, 99-106.
- Naylor, R. L., Hardy, R. W., Buschmann, A. H., Bush, S. R., Cao, L., Klinger, D. H., Little, D. C., Lubchenco, J., Shumway, S. E., & Troell, M., 2021. A 20-year retrospective review of global aquaculture. *Nature*, 591, 551-563.
- Nunan, L., Lightner, D., Pantoja, C., & Gomez-Jimenez, S. (2014). Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. *Diseases of Aquatic Organisms*, 111, 81-86.
- Páez-Osuna, F., Gracia, A., Flores-Verdugo, F., Lyle-Fritch, L. P., Alonso-Rodríguez, R., Roque, A., & Ruiz-Fernández, A. C. (2003). Shrimp aquaculture development and the environment in the Gulf of California ecoregion. *Marine Pollution Bulletin*, 46, 806-815.
- Piewngam, P., Zheng, Y., Nguyen, T. H., Dickey, S. W., Joo, H. S., Villaruz, A. E., Glose, K. A., Fisher, E. L., Hunt, R. L., Li, B., Chiou, J., Pharkjaksu, S., Khongthong, S., Cheung, G. Y. C., Kiratisin, P., & Otto, M. (2018). Pathogen elimination by probiotic *Bacillus* via signalling interference. *Nature*, 562, 532-537.
- Restrepo, L., Domínguez-Borbor, C., Bajaña, L., Betancourt, I., Rodríguez, J., Bayot, B., & Reyes, A. (2021). Microbial community characterization of shrimp survivors to AHPND challenge test treated with an effective shrimp probiotic (*Vibrio diabolicus*). *Microbiome*, 9, 88.
- Robalino, J., Browdy, C. L., Prior, S., Metz, A., Parnell, P., Gross, P., & Warr, G. (2004). Induction of antiviral immunity by double-stranded RNA in a marine invertebrate.

- Journal of Virology, 78, 10442-10448.
- Robalino, J., Bartlett, T., Shepard, E., Prior, S., Jaramillo, G., Scura, E., Chapman, R. W., Gross, P. S., Browdy, C. L., & Warr, G. W. (2005). Double-stranded RNA induces sequence-specific antiviral silencing in addition to nonspecific immunity in a marine shrimp: convergence of RNA interference and innate immunity in the invertebrate antiviral response? *Journal of Virology*, 79, 13561-13571.
- Rocha, J., Garcia-Carreño, F. L., Muhlia-Almazán, A., Peregrino-Uriarte, A. B., Yépez-Plascencia, G., & Córdova-Murueta, J. H. (2012). Cuticular chitin synthase and chitinase mRNA of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* during the molting cycle. *Aquaculture*, 330, 111-115.
- Rungrasamee, W., Klanchui, A., Chaiyapechara, S., Maibunkaew, S., Tangphatsornruang, S., Jiravanichpaisal, P., & Karoonuthaisiri, N. (2013). Bacterial population in intestines of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) under different growth stages. *PloS One*, 8, e60802.
- Sakai, M. (1999). Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172, 63-92.
- 酒井正博. (2013). 「免疫賦活剤」, 青木宙編『魚介類の微生物感染症の治療と予防』, 恒星社厚生閣, pp. 445-452.
- 坂田泰造・垂野信行 (1987a). クルマエビ消化管内細菌に関する生態学的研究-I 消化管内細菌相の変動. *水産増殖*, 35, 5-9.
- 坂田泰造・垂野信行 (1987b). クルマエビ消化管内細菌に関する生態学的研究-II 腸内および病エビ筋肉分離ビブリオ属菌の性状. *水産増殖*, 35, 153-160.
- Saleh, M. C., van Rij, R. P., Hekele, A., Gillis, A., Foley, E., O'Farrell, P. H., & Andino, R.

- (2006). The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing. *Nature Cell Biology*, 8, 793-802.
- Saulnier, D., Haffner, P., Goarant, C., Levy, P., & Ansquer, D. (2000). Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. *Aquaculture*, 191, 133-144.
- Schar, D., Zhao, C., Wang, Y., Larsson, D. G., Gilbert, M., & Van Boeckel, T. P. (2021). Twenty-year trends in antimicrobial resistance from aquaculture and fisheries in Asia. *Nature Communications*, 12, 5384.
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S., & Huttenhower, C. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology*, 12, R60.
- Shoskes, D. A., Altemus, J., Polackwich, A. S., Tucky, B., Wang, H., & Eng, C. (2016). The urinary microbiome differs significantly between patients with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome and controls as well as between patients with different clinical phenotypes. *Urology*, 92, 26-32.
- Snieszko, S. F. (1974). The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *Journal of Fish Biology*, 6, 197-208.
- Soonthornchai, W., Chaiyapechara, S., Jarayabhand, P., Söderhäll, K., & Jiravanichpaisal, P. (2015). Interaction of *Vibrio* spp. with the inner surface of the digestive tract of *Penaeus monodon*. *PloS One*, 10, e0135783.
- Soto-Rodriguez, S. A., Gomez Gil, B., Roque, A., Lozano, R. (2010). Density of vibrios in hemolymph and hepatopancreas of diseased Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, from northwestern Mexico. *Journal of World Aquaculture Society*, 41, 76–83.
- Stumpff, M., Hu, M. Y., Tseng, Y. C., Guh, Y. J., Chen, Y. C., Yu, J. K., Su, Y. H., & Hwang, P. P. (2015). Evolution of extreme stomach pH in bilateria inferred from gastric

- alkalization mechanisms in basal deuterostomes. *Scientific Reports*, 5, 10421.
- Subasinghe, R. P., Delamare-Deboutteville, J., Mohan, C. V., & Phillips, M. J. (2019). Vulnerabilities in aquatic animal production. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 38, 423-436.
- Suchodolski, J. S., Foster, M. L., Sohail, M. U., Leutenegger, C., Queen, E. V., Steiner, J. M., & Marks, S. L. (2015). The fecal microbiome in cats with diarrhea. *PloS One*, 10, e0127378.
- Sun, Y. D., Fu, L. D., Jia, Y. P., Du, X. J., Wang, Q., Wang, Y. H., Zhao, X. F., Yu, X. Q., & Wang, J. X. (2008). A hepatopancreas-specific C-type lectin from the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* exhibits antimicrobial activity. *Molecular Immunology*, 45, 348-361.
- Sun, S., Jones, R. B., & Fodor, A. A. (2020). Inference-based accuracy of metagenome prediction tools varies across sample types and functional categories. *Microbiome*, 8, 46.
- 高橋幸則・下山泰正・桃山和夫 (1985). 養殖クルマエビから分離された *Vibrio* 属細菌の病原性ならびに性状. *日本水産学会誌*, 51, 721-730.
- Takahashi, Y., Kondo, M., Itami, T., Honda, T., Inagawa, H., Nishizawa, T., Soma, G., & Yokomizo, Y. (2000). 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*, 10, 555-558.
- Tang, W. J., Fernandez, J. G., Sohn, J. J., & Amemiya, C. T. (2015). Chitin is endogenously produced in vertebrates. *Current Biology*, 25, 897-900.
- Thitamadee, S., Prachumwat, A., Srisala, J., Jaroenlak, P., Salachan, P. V., Sritunyalucksana,

- K., Flegel, T. W., & Itsathitphaisarn, O. (2016). Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. *Aquaculture*, 452, 69-87.
- Thuong, K. V., Tuan, V. V., Li, W., Sorgeloos, P., Bossier, P., & Nauwynck, H. (2016). Per os infectivity of white spot syndrome virus (WSSV) in white-legged shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and role of peritrophic membrane. *Veterinary Research*, 47, 39.
- Tiffany, C. R., & Bäumlner, A. J. (2019). Dysbiosis: from fiction to function. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 317, G602-G608.
- Tinwongger, S., Nochiri, Y., Thawonsuwan, J., Nozaki, R., Kondo, H., Awasthi, S. P., Hinenoya, A., Yamasaki, S., & Hirono, I. (2016). Virulence of acute hepatopancreatic necrosis disease Pir AB-like relies on secreted proteins not on gene copy number. *Journal of Applied Microbiology*, 121, 1755-1765.
- Tran, L., Nunan, L., Redman, R. M., Mohney, L. L., Pantoja, C. R., Fitzsimmons, K., & Lightner, D. V. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 105, 45-55.
- Turner, M. W. (1996). Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunology Today*, 17, 532-540.
- Vijayan, K. K., Raj, V. S., Balasubramanian, C. P., Alavandi, S. V., Sekhar, V. T., & Santiago, T. C. (2005). Polychaete worms—a vector for white spot syndrome virus (WSSV). *Diseases of Aquatic Organisms*, 63, 107-111.
- Walker, P. J., & Mohan, C. V. (2009). Viral disease emergence in shrimp aquaculture: origins, impact and the effectiveness of health management strategies. *Reviews in Aquaculture*, 1, 125-154.
- Wang, C. Z., Lin, G. R., Yan, T., Zheng, Z. P., Chen, B., & Sun, F. L. (2014). The cellular

- community in the intestine of the shrimp *Penaeus penicillatus* and its culture environments. *Fisheries Science*, 80, 1001-1007.
- Wang, J., Huang, Y., Xu, K., Zhang, X., Sun, H., Fan, L., & Yan, M. (2019). White spot syndrome virus (WSSV) infection impacts intestinal microbiota composition and function in *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 84, 130-137.
- Wang, L., Li, F., Wang, B., & Xiang, J. (2012). Structure and partial protein profiles of the peritrophic membrane (PM) from the gut of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 33, 1285-1291.
- Wang, X. W., Xu, W. T., Zhang, X. W., Zhao, X. F., Yu, X. Q., & Wang, J. X. (2009). A C-type lectin is involved in the innate immune response of Chinese white shrimp. *Fish & Shellfish Immunology*, 27, 556-562.
- Xu, Z., Takizawa, F., Casadei, E., Shibasaki, Y., Ding, Y., Sauters, T. J. C., Yu, Y., Salinas, I., & Sunyer, J. O. (2020). Specialization of mucosal immunoglobulins in pathogen control and microbiota homeostasis occurred early in vertebrate evolution. *Science Immunology*, 5, 3254.
- Zelensky, A. N., & Gready, J. E. (2005). The C-type lectin-like domain superfamily. *The FEBS Journal*, 272, 6179-6217.
- Zhan, P., Li, L., Tang, C., Yang, P., Hu, H., Penuelas, J., & Tong, C. (2021). Successional patterns of bacterial communities and their functions in shrimp aquaculture pond water across farming phases. *Aquaculture Research*, 52, 6322-6337.
- Zhang, X. W., Xu, W. T., Wang, X. W., Mu, Y., Zhao, X. F., Yu, X. Q., & Wang, J. X. (2009). A novel C-type lectin with two CRD domains from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* functions as a pattern recognition protein. *Molecular Immunology*, 46, 1626-1637.
- Zhang, X., Yuan, J., Sun, Y., Li, S., Gao, Y., Yu, Y., Liu, C., Wang, Q., Lv, X., Zhang, X., Ma,

- K. Y., Wang, X., Lin, W., Wang, L., Zhu, X., Zhang, C., Zhang, J., Jin, S., Yu, K., Kong, J., Xu, P., Chen, J., Zhang, H., Sorgeloos, P., Sagi, A., Alcivar-Warren, A., Liu, Z., Wang, L., Ruan, J., Chu, K. H., Liu, B., Li, F., & Xiang, J. (2019). Penaeid shrimp genome provides insights into benthic adaptation and frequent molting. *Nature Communications*, 10, 356.
- Zhang, Y., Zhou, S., Zhou, Y., Yu, L., Zhang, L., & Wang, Y. (2018). Altered gut microbiome composition in children with refractory epilepsy after ketogenic diet. *Epilepsy Research*, 145, 163-168.
- Zhang, Y. X., Zhang, M. L., & Wang, X. W. (2021). C-type lectin maintains the homeostasis of intestinal microbiota and mediates biofilm formation by intestinal bacteria in shrimp. *The Journal of Immunology*, 206, 1140-1150.
- Zhou, L., Qu, Y., Qin, J. G., Chen, L., Han, F., & Li, E. (2021). Deep insight into bacterial community characterization and relationship in the pond water, sediment and the gut of shrimp (*Penaeus japonicus*). *Aquaculture*, 539, 736658.
- Zindl, J., & Kubes, P. (2020). DAMPs, PAMPs, and LAMPs in immunity and sterile inflammation. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 15, 493-518.

Figures

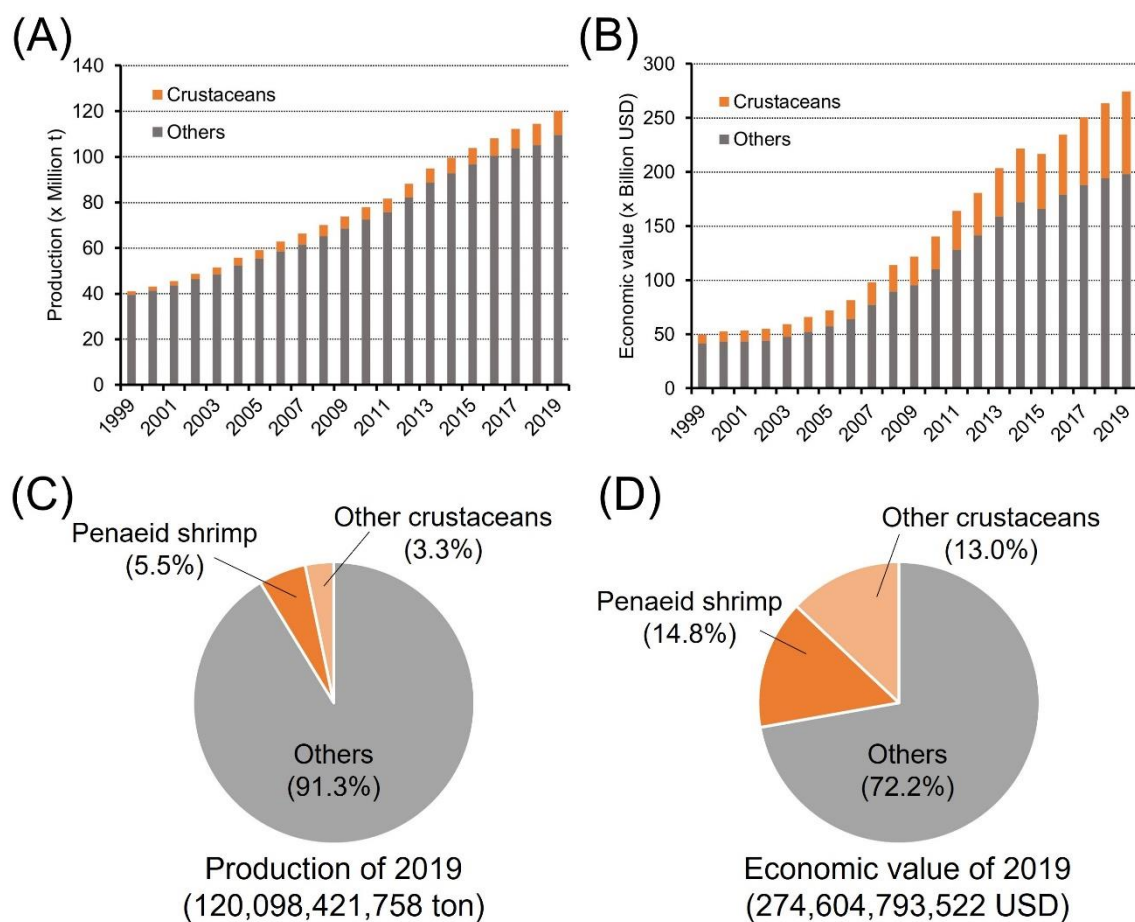


Fig. 1. Production and economic value of crustaceans and other aquatic organisms (FAO, 2021). (A) Global aquaculture production of 1999 to 2019 (Million ton). (B) Economic value of aquaculture production of 1999 to 2019 (Billion USD). (C) Aquaculture production of 2019. (D) Economic value of aquaculture production of 2019.

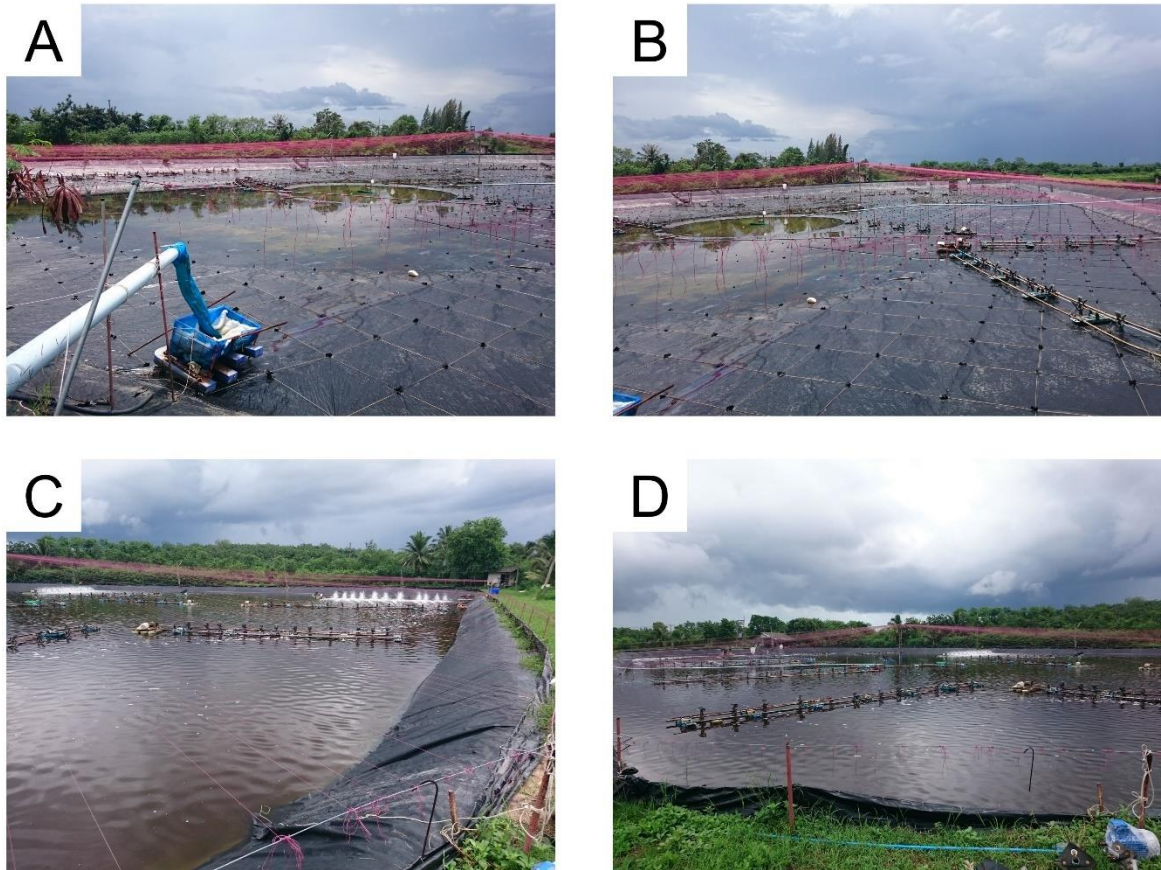


Fig. 2. Aquaculture ponds of whiteleg shrimp in Thailand. The bottom of pond is covered with plastic sheet (A and B). Wheel is used for aeration and the edge of pond is protected from entering of exogenous organisms by plastic sheet rose from the earth (C and D).

第二章

Analysis of microbiota in the stomach and midgut of two penaeid shrimps during probiotic feeding

(プロバイオティクス投与中の二種のクルマエビ類における胃および中腸の細菌叢)

哺乳類モデル生物と同様に、クルマエビ類においても腸内細菌が免疫系の働きや感染症発生などといった宿主の健康に関わる重要な因子であると考えられている。しかしながら、クルマエビ類の消化管システムは哺乳類のそれとは大きく異なる。加えて、クルマエビ類における細菌感染症の発生メカニズムは、腸管以外の部位における細菌叢の重要性を予想させる。そこで本研究では、プロバイオティクス投与中のバナメイエビの胃および中腸、クルマエビの胃内容物および中腸内容物の細菌叢を解析した。

バナメイエビについては東京海洋大学ゲノム科学研究室で飼育した個体を使用した。*Bacillus amyloliquefaciens* TOA5001 株芽胞を餌料に混ぜ、給餌した。胃（前腸）および腸管を採取し、DNA 抽出を行い、PCR によって 16S rRNA 遺伝子の増幅を行った。クルマエビについては沖縄県久米島の養殖場にて同様に TOA5001 株芽胞を餌料に混ぜて給餌し、生きた状態で空輸して解析に供した。胃内容物および腸管内容物を採取し、DNA 抽出と 16S rRNA 遺伝子の増幅を行った。バーコード配列を付加したこれらの PCR 産物を精製し、ライブラリーを作製した。次世代シーケンサー MiSeq で配列決定を行い、解析パイプライン Qiime2 を使用して配列データの解析を行った。

バナメイエビおよびクルマエビのいずれにおいても、胃における細菌組成は中腸の細菌組成と比較して明らか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消化管構造の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。これに加えて、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。

第三章

Bacterial and eukaryotic communities in pond water of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* and the bacterial communities of their stomach and midgut

(バナメイエビ養殖池水の微生物組成およびそこで飼育されたエビの胃および中腸の細菌叢)

養殖池水中や消化管内に存在する微生物群は、バナメイエビを含むクルマエビ類の健康と密接に関連していることが予想されており、近年では、次世代シーケンサーを使用した微生物叢の網羅的な解析が実施されている。しかしながら、実際の養殖池において継続的な比較研究が行われた例は少なく、エビを取り巻く環境の微生物群の動態は未だ明らかでない。そこで、本研究ではタイ国のバナメイエビ養殖場にて養殖池水中の微生物叢（細菌および真核プランクトン）およびエビ消化管中の細菌叢の解析を行った。

タイ国南部スラターニーのバナメイエビ養殖場に存在する養殖池2池を対象にサンプル採取を行った。各池の3地点から7日間にわたって表層水を採取した。同時に、各池のバナメイエビの胃および中腸を採取した。池水中の微生物をメンブレンフィルターでろ過し、DNAを抽出した。エビ消化管についても同様にDNAを抽出した。池水サンプルについては16S rDNAおよび18S rDNAの部分配列をそれぞれPCRによって増幅した。エビ消化管サンプルについては16S rDNAを増幅した。これらをイルミナシーケンシングに供し、得られた配列情報についてQiime2等のパイプラインを使用して解析した。

供試したバナメイエビの養殖池水中の細菌組成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。これらについて主座標分析を行うと、細菌組成が池ごとに明確に異なることと、それらが段階的に変化していたことが明らかとなった。さらに、養殖池水中の真核プランクトン組成は池ごとに大きく異なり、ともに、日ごとに大きく変化することが明らかとなった。加えて、バナメイエビの消化管中の細菌組成は池ごとに異なり、一方の池のエビの胃において Mollicutes 綱細菌が優占種となっていたことが見出された。NGS 解析の結果に基づくと、この細菌は *Candidatus Bacilloplasma* に近縁であると考えられた。池水中の細菌だけでなく真核プランクトンおよび胃を含めたエビ消化管内の細菌組成を解析することで、より良い養殖環境を作り出すための知見を得ることにつながると考えられる。

第四章

Peritrophic membrane and a chitin synthase which expresses in the digestive tract of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*

(クルマエビの囿食膜構造とキチン合成酵素)

哺乳類を除く多くの生物において、腸管におけるキチン合成系の存在が知られている。腸上皮で形成されるキチンを骨格とした膜構造、すなわち囿食膜によって腸管内容物と腸上皮は物理的に隔てられており、囿食膜はバリア機構としての役割を担っていると考えられている。節足動物では、昆虫類を対象とした囿食膜研究が行われてきたが、甲殻類の囿食膜に関する知見は少ない。本研究では、クルマエビの腸管の組織学的検討とキチン合成酵素遺伝子の解析を行った。

クルマエビの消化管をパラフィン包埋化し、正中線に対して垂直方向（輪切り）に切片を作製し、顕鏡した。クルマエビの発現遺伝子データベースからキチン合成酵素遺伝子を探索し、cDNA 配列を決定するとともに演繹アミノ酸配列を解析した。また、体サイズの異なるクルマエビについて RT-PCR による発現組織解析を行った。

クルマエビにおいて、腸管内容物はチューブ状の薄膜に包まれており、腸上皮と物理的に隔離されていることが確認され、この薄膜は昆虫類に存在する囿食膜と相同であると考えられた。1523 アミノ酸残基からなるクルマエビのキチン合成酵素は N 末端側に 9 つ、C 末端側に 7 つの膜貫通領域を有し、その中間に存在する酵素ドメインは、昆虫類および他の甲殻類の生物種間で高度に保存されていた。また、クルマエビのキチン合成酵素遺伝子は、エビの体サイズを問わず中腸

および中腸線において発現しており、囲食膜を構成するキチンの産生に関与していると考えられた。稚エビでは、他の組織でも転写産物が検出されたことから、当該のキチン合成酵素は外骨格を構成するキチンの合成にも関与している可能性がある。クルマエビの腸上皮と腸内容物は囲食膜によって隔てられており、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る。

第五章

A mucosal C-type lectin contributes to the homeostasis of gill microbiota of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*

(クルマエビの粘膜組織で発現している C 型レクチン MjGCTL はエラにおける細菌叢制御に関与している)

水生生物においては消化管だけでなくエラにおける細菌叢が宿主生物の健康維持に重要であると予想される。脊椎動物では、免疫系の働きによって粘膜組織の細菌叢の恒常性が積極的に制御されるが、無脊椎動物における粘膜組織の細菌叢制御メカニズムには依然として不明な点が多い。本研究では、クルマエビの粘膜組織で特異的に発現している C 型レクチン (MjGCTL) の役割について、細菌叢と感染症に着目して研究を行った。

クルマエビに MjGCTL の遺伝子配列特異的二本鎖 RNA (dsRNA) を接種することによって、RNA 干渉による遺伝子ノックダウンを行った。試験群として、PBS 接種群、dsGFP 接種群および dsMjGCTL 接種群を設定した (n = 6-7)。接種三日後の個体からエラおよび胃を採取し、RT-qPCR によって標的遺伝子がノックダウンされていることを確認した。同個体由来のサンプルから DNA を抽出し、16S rDNA の部分配列を増幅し、イルミナシーケンシングに供して得られた配列情報を解析した。また、同様の試験群に対して、クルマエビの鰓黒病を引き起こす病原性の真菌 (*Fusarium* sp.) による浸漬感染試験を行った。

クルマエビの体重 1 g あたり 3 μ g の dsRNA を接種することによって遺伝子ノックダウンを行うことができた。MjGCTL をノックダウンした試験群では、エラに

において特定の細菌群の顕著な減少が認められた。これに伴って、他の細菌群の相対的存在量が増加し、多様性指数は増加する傾向にあった。胃の細菌叢に試験区間の顕著な差はみられなかった。MjGCTLをノックダウンした試験群では、対照群と比較して *Fusarium sp.*感染後の斃死が顕著に早かった。クルマエビは宿主免疫系の働きによってエラ細菌叢を積極的に制御していると考えられ、これが病原微生物に対する感受性に関係していることが示唆された。

第六章 総合考察

本研究は、クルマエビ類の消化管やエラの細菌叢および養殖環境中の微生物叢に関して網羅的な解析を行い、その特徴を明らかにするとともにエビの生体システムとの関連についても検討を行った。その結果、クルマエビ類は消化管内に外部環境と異なる特有の細菌を有し、胃から中腸に進むにつれてその多様性が低下することが明らかとなった。既知のビブリオ属細菌の感染メカニズムとして胃における病原細菌の定着と増殖が知られており（桃山・室賀、2005; Tran et al., 2013; Lai et al., 2015）、AHPNDの発生に関連してバナメイエビの胃細菌叢が解析された研究例が報告されている（Chen et al., 2017）。本研究では、これをさらに一般化して、クルマエビ類の健康における胃細菌叢の重要性を提言する。クルマエビ類の胃は、哺乳類における腸管のように微生物が定着し宿主に影響を及ぼし得る器官であるがゆえに、病原微生物の感染部位となるのだと考えられる。また、プロバイオティクスの経口投与は、クルマエビ類の胃細菌叢を変化させる可能性が示された。今後は、どのような胃細菌叢がクルマエビ類にとって良い状態なのか、そしてこれをどのように人為的に操作するかといった点について研究を行う必要がある。

実際のバナメイエビ養殖池の池水における微生物叢を解析すると、ひとつの養殖場に存在する同様の養殖池であっても、池水の細菌組成および真核微生物組成が異なることが明らかとなった。特に、真核微生物叢は急速に変遷していくことが観察された。これは、フィールドでの実験を計画するうえで重要な基礎的知見である。上記では、クルマエビの消化管における細菌叢の特徴をエビの生体システムと関連させて考察し、胃細菌叢の重要性を提案した。これに加えて、現場でのサンプル採

取では胃の方が腸管よりも圧倒的に採取しやすい。肝臓を損傷しないよう気をつける必要があるが、頭胸部を切り開けば胃が容易に取り出せる。反対に、内容物を失わないよう腸管を取り出そうとすれば、背側の殻と筋肉を尾肢付近から頭胸部の付け根まで一直線に切り開かなければならず、煩雑な作業となる。これもまた、胃を解析する利点の一つである。

それでは、腸管はどうなのか。水産分野では、餌料添加物や感染症がエビの腸内細菌に及ぼす影響に関する研究が盛んに行われている (Holt et al., 2021)。本研究では、クルマエビの腸管で形成される囲食膜に着目した。他の生物群と同様に (Nakashima et al., 2018)、クルマエビの腸管には非細胞性の薄膜が存在することが観察された。さらに、中腸の転写産物からキチン合成酵素 mRNA 配列を単離することに成功した。クルマエビの腸管内容物やその中の微生物群は、囲食膜によって腸上皮より物理的に隔離されているがゆえに、腸管内に定着し続けることはないと考えられる。したがって、従来の研究で解析されていたエビの“腸内細菌”は、腸管に定着している細菌ではなく、消化管のより上流に位置する器官、例えば胃や肝臓から流れ下ってきたものである。前述の、中腸における細菌組成の多様性の低さは、このような消化管の構造的な特徴によってもたらされていると考えられる。したがって、従来の腸内細菌解析のみでは、発見されるべき重要な現象が見過ごされていたおそれがある。

クルマエビ類は粘膜組織の細菌叢の恒常性をどのように制御しているのか。本研究では、クルマエビの C 型レクチン (MjGCTL) (Alenton et al., 2017; Alenton et al., 2019) に着目した。この MjGCTL の興味深い点は、明確に粘膜組織のみで発現し

ている点であり、最も発現量が多いと考えられるのがエラである。また、消化管をみると、胃および後腸でその転写産物が検出されることは対照的に、中腸では発現が認められない。RNAiによって MjGCTL をノックダウンすると、クルマエビのエラ細菌叢に顕著な変化がみられた。しかしながら、胃細菌叢に対する明確な影響は検出できなかった。続いて、エラ黒病原菌である *Fusarium* sp.による感染試験を行うと、MjGCTL をノックダウンしたクルマエビの斃死は、他の試験区と比較して顕著に早かった。したがって、クルマエビはエラ細菌叢を自然免疫系の働きによって積極的に制御しており、これが生体防御に関与していることが強く示唆される。胃に関しては、本研究結果のみからは、その細菌叢が宿主免疫によって制御されているか否かについては結論を保留とするほかない。今後の研究によって、クルマエビ類の胃細菌叢が制御されるメカニズムの解明が果たされることが望まれる。

クルマエビ類の養殖環境に存在する未分離の細菌の多くについては研究がほとんど進められておらず、データベースから分類群を推定することに限界が生じている。本研究でも、*Candidatus Bacilloplasma* に近縁と考えられる細菌がエビの消化管で優占種となっていたが、こうした細菌についてはほとんど研究されていない。ショットガンメタゲノムやシングルセルメタゲノムなどの最新の手法を利用していくことで、クルマエビ類を取り巻く微生物群のより正確な解析が可能となるかもしれない。また、それらがより効率的なクルマエビ類養殖の達成につながることを期待する。

従来の研究では、エビの自然免疫系の働きを利用した感染症防除法の開発が主な目標であった。実際、種々の免疫賦活剤に関する研究報告によれば、感染症による

エビの斃死を防ぐうえで一定の効果が期待できるようである。しかしながら、エビの生体防御機構のもう一つのメインプレイヤーであるバリア機構に着目した研究はほとんど存在しない。体の中に病原微生物を侵入させなければ、病気になることは滅多にない。本研究の成果をもとに、エビの腸管に存在する物理的バリア機構や、胃の常在細菌といった生物学的バリア機構をターゲットに感染症防除技術の開発が行えるのではないか。

クルマエビ類は、魚類と比較してゆっくりとエサを食べる生き物である。栄養源の豊富な餌料に水中の細菌が付着すれば、たちまち増殖し、これを食したエビの消化管内に侵入する。このとき、事前に無害な細菌を餌料に定着させておけば、有害細菌の増殖を抑えることができる。実際の養殖現場に最適なプロバイオティクスの使用法を考えていくうえで、いかにして病原細菌の経口的な侵入を防ぐか、という視点を持った研究を行うことも一つの選択肢でないだろうか。

昨今のオミクス解析の普及によって、非モデル生物であるクルマエビ類においても転写産物や微生物叢の網羅的解析が行われるようになってきている。しかしながら、哺乳類や昆虫類のモデル生物で確立された知見をクルマエビ類にそのままあてはめることが妥当であるかは、よく吟味しなければならない。Goodrichら(2014)による Microbiome 解析の手引き内の Fig. 1 に、研究手順のフローチャートがある。これによれば、研究の開始地点は “Develop a question” である。かつて Sydney Brenner 博士が指摘したように、“low input, high throughput, no output science” (Friedberg, 2008) になってしまわぬようエビをよく観察し、面白い問いをたて、それを解決することでエビ養殖のさらなる発展に寄与したいものである。

引用文献

- Alenton, R. R. R., Koiwai, K., Miyaguchi, K., Kondo, H., & Hirono, I. (2017). Pathogen recognition of a novel C-type lectin from *Marsupenaeus japonicus* reveals the divergent sugar-binding specificity of QAP motif. *Scientific Reports*, 7, 45818.
- Alenton, R. R. R., Koiwai, K., Nakamura, R., Thawonsuwan, J., Kondo, H., & Hirono, I. (2019). A hint of primitive mucosal immunity in shrimp through *Marsupenaeus japonicus* gill C-type lectin. *The Journal of Immunology*, 203, 2310-2318.
- Chen, W. Y., Ng, T. H., Wu, J. H., Chen, J. W., & Wang, H. C. (2017). Microbiome dynamics in a shrimp grow-out pond with possible outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease. *Scientific Reports*, 7, 9395.
- Friedberg, E. C. (2008). Sydney Brenner. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9, 8-9.
- Goodrich, J. K., Di Rienzi, S. C., Poole, A. C., Koren, O., Walters, W. A., Caporaso, J. G., Knight, R., & Ley, R. E. (2014). Conducting a microbiome study. *Cell*, 158, 250-262.
- Holt, C. C., Bass, D., Stentiford, G. D., & van der Giezen, M. (2021). Understanding the role of the shrimp gut microbiome in health and disease. *Journal of Invertebrate Pathology*, 186, 107387.
- Lai, H. C., Ng, T. H., Ando, M., Lee, C. T., Chen, I. T., Chuang, J. C., Mavichake, R., Chang, S. H., Yeh, M. D., Chiang, Y. A., Takeyama, H., Hamaguchi, H., Lo, C. H., Aoki, T., & Wang, H. C. (2015). Pathogenesis of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *Fish and Shellfish Immunology*, 47, 1006-1014.
- 桃山和夫・室賀清邦 (2005). 日本の養殖クルマエビにおける病害問題. *魚病研究*, 40, 1-14.
- Nakashima, K., Kimura, S., Ogawa, Y., Watanabe, S., Soma, S., Kaneko, T., Yamada, L., Sawada, H., Tung, C. H., Lu, T. M., Yu, J. K., Villar-Briones, A., Kikuchi, S., & Satoh,

N. (2018). Chitin-based barrier immunity and its loss predated mucus-colonization by indigenous gut microbiota. *Nature Communications*, 9, 3402.

Tran, L., Nunan, L., Redman, R. M., Mohny, L. L., Pantoja, C. R., Fitzsimmons, K., & Lightner, D. V. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 105, 45-55.