



|                     |                                                                                                                                               |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | Community structure, function, and dynamics of sea cucumber gut microbiome [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review] |
| Author(s)           | 山崎, 耀平                                                                                                                                        |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                                                                         |
| Degree Name         | 博士(水産科学)                                                                                                                                      |
| Dissertation Number | 甲第13886号                                                                                                                                      |
| Issue Date          | 2020-03-25                                                                                                                                    |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/77849">https://hdl.handle.net/2115/77849</a>                                                             |
| Rights(URL)         | <a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>                                       |
| Type                | doctoral thesis                                                                                                                               |
| File Information    | Yohei_Yamazaki_abstract.pdf, 論文内容の要旨                                                                                                          |



# 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（水産科学）

氏名：山 崎 耀 平

## 学位論文題目

Community structure, function, and dynamics of sea cucumber gut microbiome

(ナマコ消化管マイクロバイオームの群集構造、機能およびダイナミクス)

ナマコ類（綱）は新口動物上門棘皮動物門に属する底生生物であり、ヒトが属する脊索動物門と系統を分かち合う。ナマコの多くの種が、外部刺激への応答として内臓吐出を行ない、その後数週間で消化管を再生する特異な特徴を示すことから、消化管再生のモデル生物となっている。生態学的には、ナマコ類は、摂餌行動に伴う活発な底質の攪拌や浄化、物質循環の促進により、底生生物相の安定化に影響する重要な役割を担っている。また、70 種以上が食用として漁獲されてきたが、乱獲により天然資源の再生産が不均衡となり、マナマコ *Apostichopus japonicus* やバイカナマコ *Thelenota ananas* などが絶滅危惧種に指定されている。ナマコの増養殖技術の開発が進められてきたが、種苗生産過程で糜爛などの疾病や著しい成長格差が生じ安定的かつ集約的な増養殖技術は構築できていない。さらに、ナマコの自然界における食性については不明な点が多く、優れた人工餌料の開発を妨げている。

近年、動物の消化管微生物叢が食餌の分解・吸収、免疫系、脳や行動にまで重大な影響を与えることが示されており、動物の生理・生態を完全に理解する上で欠かすことのできない要素であることが理解されつつある。さらに、ヒトでは、プロバイオティクスの開発など腸内細菌がホストの健康維持や疾病の治療に利用されている。それゆえ、消化管微生物叢を含めたナマコの生物学的理解や、プロバイオティクスの開発は安定した種苗生産技術の開発に極めて有益であると考えられる。

これまで、培養依存的あるいは非依存的な手法を用いて、ナマコ消化管微生物叢の特徴付けが行われてきた。それにより、ナマコの消化管微生物叢には *Proteobacteria* や *Bacteroidetes* が優占すること、微生物の群集構造は消化管と堆積物間で、そして消化管の部位ごとにも異なること、さらには *Rhodobacterales* がホストの免疫系を活性化する可能性が示唆されてきた。加えて、成長促進や免疫活性化作用に基づいて、*Bacillus* や *Vibrio* がナマコのプロバイオティクス候補として提案されている。しかしながら、希少な自然界のナマコ個体の減耗を促すことなく、個体ごとに消化管微生物叢の構造・機能・ダイナミクスを解析する方法論は報告例がなく、ナマコ消化管微生物叢の構築過程や、消化管微生物叢と宿主生理生態との関係はほとんど明らかにされていない。さらには、ナマコと微生物間の相互作用を解明するための個体追跡実験系も現在までに知られていない。そこで本研究では、ナマコの消化管微生物叢の研究を進展させる新たな方法論を構築し、これによりナマコとその消化管微生物叢について理解を深めることを目的とした。

第 1 章では、養殖マナマコを対象に、ナマコを殺すことなく個体ごとに消化管微生物叢を解析する方法論を構築し、これを用いてマナマコの種苗生産過程で生じる成長格差と消化管微生物叢の関係について検討を行なった。メタ 16S 解析により成長の良い群と悪い群の糞便微生物叢を比較した結果、両群間で有意に異なっており、成長の良い群の微生物叢には、*Rhodobacterales* や *Desulfobacterales* などの細菌群の占有率が有意に高かった。続いて、メタゲノム解析を行なったところ、成長の良い個体にはポリヒドロキシ酪酸 (PHB) 代謝に関わる遺伝子を持つ細菌の頻度が有意に高く、この配列の多くが *Rhodobacterales* に由来することが示唆された。さらに、実際にマナマコの糞便から PHB を生産する *Rhodobacterales* 細菌

も分離できた。PHB は主に微生物が炭素源の豊富な環境下で蓄積する細胞内顆粒であり、先行研究で、アルテミアやチョウザメなどの水産動物への成長促進効果が報告されている。以上より、PHB を生産する *Rhodobacterales* がマナマコの成長格差の一因である可能性が示唆された。

第 2 章および 3 章では、前章で構築した手法を自然界のナマコに応用した。第 2 章では、メタ 16S 解析に基づいて、ナマコ消化管細菌叢の季節変化、形成過程、およびホストの生態学的機能への影響を調べた。UniFrac 解析により、一年間を通してマナマコの糞便と堆積物の細菌叢は有意に異なること、さらに両細菌叢は季節ごとに連動して変化することが示された。また、糞便に見られるほとんどの細菌が堆積物と共通していた。さらに、糞便細菌叢の多様性は堆積物よりも有意に低いこと、堆積物よりも糞便で占有率が増大する *Vibrionales*, *Rhodobacterales*, *Flavobacteriales* などの細菌群が確認されたことから、マナマコの糞便細菌叢は堆積物細菌叢に由来する特定の細菌群がエンリッチメントされることにより形成されていることが示唆された。熱帯性ナマコ 4 種を対象に同様の比較をしたところ、上述の形成過程を支持する結果を得た。また、糞便と堆積物の細菌叢の代謝ポテンシャル予測から、炭水化物代謝や異物代謝などの有機物分解ポテンシャルは堆積物よりも糞便で有意に高いことが示された。以上のことから、ナマコが摂餌と排泄を繰り返し、消化管内で連続的な堆積物細菌のエンリッチメントが起き、有機物分解が促進され、ナマコの底質浄化や物質循環などに関与している可能性が示唆された。

第 3 章では、前章で得られた 16S データから藻類の葉緑体に由来する配列を抽出、解析を行ない、消化管真核生物群集の食性指標としての有効性を検討した。マナマコの糞便と堆積物の真核生物群集について Bray-Curtis 解析を行なった結果、前章の細菌叢とは異なり、糞便と堆積物間の真核生物群集の差異は明瞭でなく、季節ごとに大きく変化していた。続いて、堆積物よりも糞便で占有率が高くなることを指標にマナマコが選択的に摂餌する藻類を推定した結果、*Chaetocerotaceae* や *Laminariaceae* を好んで食べている可能性が見いだされた。興味深いことに、*Laminariaceae* に帰属するほとんどの藻類はマコンブであり、このことはマコンブがマナマコの成長に最も好適な餌の一つとして利用されていることと一致した。

第 4 章では、これまでの解析手法を発展させ、消化管微生物叢の生物学的・物理学的的外部刺激応答を調べることを可能にする屋外および室内での個体追跡実験系の構築を試み、これを用いてナマコの消化管再生過程における微生物叢のダイナミクスを解析した。屋外実験系では、ナマコの消化管微生物叢は消化管吐出後 3~4 か月で完全に再生されることが確認できた。室内実験系下では、消化管除去から 15 日後にナマコの消化管が再生し、糞便の排泄が再開された。同実験系下で、Bray-Curtis 指数に基づいて消化管除去前後の微生物叢の変化を継続的に追跡したところ、消化管吐出・再生により消化管微生物叢の形成に影響を与えたことが示唆された。消化管再生直後には、*Alteromonadaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Oceanospirillaceae* などに属する細菌群が消化管微生物叢で増大し、再生過程が進むにつれて再び減少したため、これらの細菌はホストの消化管再生過程に連動して変化する可能性が推測された。

以上、本研究では非破壊糞便微生物叢解析や個体追跡実験系など新しい方法論を構築し、ナマコの消化管微生物叢について新たな知見を得た。すなわち、ナマコの消化管では堆積物と共に取り込まれた微生物群の選択的なエンリッチメントが生じ、*Rhodobacterales*, *Vibrionales*, *Alteromonadales*, *Flavobacteriales* などの細菌群が優占する独自の微生物叢が形成されていることが示唆された。この消化管微生物叢は、PHB を介してホストへのエネルギー源供与や、餌となる有機物の分解を介して底質浄化などホストの生態学的機能の維持に貢献している可能性がある。今後、個体追跡実験系を用いて、ナマコとその消化管微生物叢の相互作用の解明を進展させることで、プロバイオティクス開発などを通して安定したナマコの増養殖技術の確立に貢献できると期待される。