

マガキ(*Crassostrea gigas*)における体表面異物侵入機構の解明

東北大学大学院農学研究科 水圏動物生理学分野 湯浅和寛

【研究の目的】

世界的に重要な水産二枚貝の1つであるマガキは、大量の海水をこすことで、そこに含まれる植物プランクトンなどの餌を採ると同時に細菌や原虫、ウイルスといった異物を体内に取り入れる。これらの異物の侵入は経口経路が大きく関与していると思われているが、近年、外套膜や鰓といった外界と接する体表面からの異物の侵入も示唆されており、経口経路だけでは説明できない点もある。外套膜や鰓といった組織において、抗菌タンパク質を代表とした強い防御機構があることから、この可能性は否定できない。

よって本研究では、いくつかの異物を用いて体表面からの異物侵入メカニズムの解明を目指す。

【研究結果の概要】

当初、上記の研究目的で進めることを考えたが、侵入してくる細菌を見る前にすでにマガキの体内にどのような種類の細菌が、どのくらいの数で存在しているのかを調べるのが先決だと考えるようになった。生体と関与する細菌というと、腸内細菌叢（マイクロバイオーム）が有名であるが、腸を含む消化管内は厳密に言えば「体外」である。そこで、マガキの血リンパに焦点をあて、そこに含まれる細菌叢を明らかにすることとした。比較対象として、消化盲嚢の細菌叢についても、生菌数を中心に解析した。

【材料と方法】

7月、9月および11月に採取した宮城県石巻市桃浦産のマガキの血リンパと消化盲嚢を対象とした。最初に、通常の養殖状態における細菌叢を調べることにした。水揚げ直後に血リンパと消化盲嚢を採取し、Marine agar 2216E 培地および TCBS 培地を用いて培養可能な細菌の生菌数および組成比を測定した。また、16S rRNA を対象としたメタゲノム解析を併せて実施し、培養できない細菌も含む網羅的な把握を行った。続いて、人為的にストレスを負荷した時の細菌叢の変化を調べた。まず、8℃、16℃、25℃の3つの異なる水温に保持した際の細菌叢の状態を、次に、水温および低溶存酸素(DO)ストレス複合区として、16℃・D0 8.2 mg/L、16℃・D01.9 mg/L、25℃・D07.1 mg/L、25℃・D02.1 mg/L と、2段階の水温と2段階の溶存酸素を組み合わせた際の細菌叢の違いを調べた。試料は開始24時間と72時間後に採取した。生菌数の測定は、血リンパ、消化盲嚢の両試料について、またメタゲノム解析は血リンパでのみ行い、結果を操作的分類単位(OTU)解析に供した。

【結果および考察】

最初に、垂下養殖下で成育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°C 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。

【総合考察】

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、日本を始め (Iami et al., 1965)、フランス (Gouilletquer et al., 1998) やアメリカ (Cheney et al., 2000; Perdue et al., 1981) など、様々な地域で報告されている。そ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。