

学位論文要旨

専攻名 生物圏生命科学専攻

氏名 水谷 雪乃

題目 Genomic and ecological studies on novel *Arcobacter* isolated from abalone (アワビから分離された新規アルコバクターに関する遺伝学および生態学的研究)

アルコバクター (*Arcobacter*) は陸生生物さらに海洋環境といった幅広い環境に生息している細菌群である。しかし、病原性をもつ種が陸生生物から単離されているため、本細菌群には“ヒトや家禽類などの陸生生物に生息する病原菌”というイメージが強く刷り込まれている。しかし近年、海水、堆積物またはカキやムール貝などの二枚貝といった海洋環境から、様々な新種のアルコバクターが単離されており、現在では種登録されている全 29 種の内、半数を超える 18 種ものアルコバクターが海洋環境から単離されている。加えて海洋環境から単離されている 18 種の内 8 種が二枚貝から単離されており、海洋環境のなかでも特に二枚貝を中心に研究が進められている。しかし、これらのアルコバクターが宿主に対してどのような働きをしているのかは未だに明らかにされておらず、海洋環境における本細菌の役割は不明のままである。これまでに、本研究室では初めて巻貝であるアワビから *A. haliotis* (heterotypic synonym: *A. lekithochrous*) の単離に成功させており、二枚貝だけでなく巻貝にも本細菌群が生息していることを推察していた。そこで海洋環境における本細菌群の新たな知見を獲得するために、アワビを対象にどのようなアルコバクターが存在しているのかを解析し、検出されたアルコバクター属細菌の単離を試みた。さらに、単離された細菌のゲノム解読を行い、アワビに生息するアルコバクターの役割を解析した。

まず、アワビにどのようなアルコバクターが存在しているのかを明らかにするため、アルコバクターの 16S rRNA 遺伝子に特異的に結合するプライマーセットを用いたクローニング解析を行った。この解析の結果、本細菌群に分類される 12 タイプの遺伝子が検出され、アワビには非常に多様なアルコバクターが生息していることが明らかとなった。さらに検出された遺伝子タイプのうち 9 タイプの遺伝子が、既存のアルコバクターと 98.7% 以下の相同性を示しており、アワビにはこれまでに報告されていない、新規のアルコバクターが複数種生息していることが確認された。また、全ての細菌の 16S rDNA に結合するプローブ (EUB338) およびアルコバクターの 16S rDNA に特異的に結合するプローブ (ARC94 probe) を用いた FISH 法を

用いて本細菌群の定量を行った。FISH法を用いた検鏡観察の結果、 $1.18 \pm 0.71 \times 10^7$ cells/g の EUB338 probe 陽性細菌および $8.06 \pm 0.05 \times 10^5$ cells/g の ARC94 probe 陽性細菌がそれぞれアワビのホモジナイズサンプルから検出された。上記の結果から、全細菌中のアルコバクターの占有率を算出すると約7%を示し、アワビ組織にアルコバクターが生息していることが確認された。

次に、2種類の単離方法を用いて、アワビからこれらのアルコバクターの単離を試みた。1つ目の単離方法は、過去にアワビから単離された *A. haliotis* が乳酸を利用して生育できる事を確認していたため、乳酸を単一炭素とした培地を用いて単離した。2つ目の単離方法は、2016年に Salas-Massóらによって提唱された単離方法を参考に、単離用培地に添加する2.5% NaClの代わりに人工海水を使用し、30°Cの培養温度を15-25°Cに改良した方法を用いた。1つ目の単離の結果、1種類の新規アルコバクターLA11株の単離に成功し、また2つ目の単離の結果、2種類の新規アルコバクター15T96H-1株及び15T96H-2株の単離に成功した。

さらに、単離に成功したLA11株のゲノム解読により、本細菌の代謝機能を推察した。ゲノム解析の結果、LA11株はグルコースの6リン酸化に関与する遺伝子をもっていないため、糖が資化できないことが確認されたものの、代わりに有機酸を資化する遺伝子を有していた。さらにLA11株のゲノムからは、気体窒素および亜硝酸をアンモニアに変換し、各代謝経路を經由して18種のアミノ酸を合成する遺伝子群が確認された。また、LA11株の代謝機能のなかには *Tad* 遺伝子と呼ばれる接着タンパクをコードする遺伝子が含まれ、この機能によりLA11株は宿主の組織に強固に固着していることが推察された。加えて、LA11株のゲノムからは病原菌である *A. butzleri* が保有する10種の病原因子のうち、*ciaB* (侵襲性タンパクの合成) および *mviN* (ペプチドグリカンの合成) は検出されたものの、宿主へと直接的なダメージを与える病原因子は検出されなかった。

以上の研究により、アワビはアルコバクターの1つの生息環境であり、これらを宿主とするアルコバクターは病原細菌ではなく、アミノ酸合成に関与する共生細菌として生息している可能性を見出した。