課題番号	23若21

若手研究者助成金　実績報告書

令和　6　年　4月　　30日

氏　　名：　　瀬川　太雄
所属・資格：生物資源科学部・助教
実施研究所：生物資源科学部・動物医科学研究センター

1　研究課題

和文表記（40字以内）
ジンベエザメ腸内に棲息する未知ウレアプラズマの分離　～野生復帰実現への第一歩～

英文表記
Isolation of Unknown *Ureaplasma* sp in the gut flora of Whale shark : the first step of breeding and releasing into the wild

2　研究期間

令和5年度

※令和　年度　～　令和　年度（※特例措置により上記期間を変更している場合記入すること）

3　研究目的

世界最大の魚類であるジンベエザメは，環境省レッドリストにて野生での絶滅が危惧されるIB類に指定され，水族館で生息域外保全が行われている．近年，こうした希少動物の共生細菌が飼育下からの野生復帰に重要なことが明らかになってきた．これまで申請者は独自の培養手法を用いてイルカの胃内優占種である新種ウレアプラズマを分離し，本種がイルカの生存に重要な役割を持つ共生細菌であることを科研費研究で解明しつつある．2022年に共同研究先の水族館がジンベエザメの腸内に未知ウレアプラズマ属細菌が豊富に棲息することを報告したことから，申請者は独自の培養手法を応用してジンベエザメの未知ウレアプラズマを分離し，その役割解明を目的とする本申請を着想した．そこで本研究はジンベエザメの腸内優占種である未知ウレアプラズマを分離し，ジンベエザメにとってどのような役割を担う細菌であるか明らかにすることを目的とする．

課題番号	23若21

4　研究概要

ジンベエザメは，最大全長約 20m，体重が 30 トンになる現生最大の魚類である．近年，ジンベエザメの生息数は激減し，環境省レッドリストで絶滅危惧 IB 類に指定され，近い将来野生での絶滅が危惧されている．そのため彼らの保全策考案が喫緊の課題となっている．

消化管内の優占種は，栄養素の産生，消化吸収の促進，免疫活性化等，生体に有益な作用を示す種が多い．2022 年に共同研究先の水族館がジンベエザメの腸内優占種が未知のウレアプラズマ属細菌であることを報告した. これまでに申請者はイルカの胃内優占種である新種ウレアプラズマ（*Ureaplasma ceti*）の培養に世界で唯一成功しており，*Ureaplasma ceti* はイルカの生存に重要な役割を持つ細菌であることを明らかにしつつある. ジンベエザメの腸内に棲息する未知ウレアプラズマも，イルカと *Ureaplasma ceti* 同様に有益な共生関係を築いている可能性が高いが，具体的にどのような共生関係があるかは不明である．この研究課題の核心をなす学術的「問い」に応えるためには，対象菌種の分離培養が必須であるが，ウレアプラズマは難培養性細菌であるため, ジンベエザメを含めた魚類での成功例がないという問題点がある．

この問題を打開するために，まず申請者は，ジンベエザメ腸内に棲息する未知ウレアプラズマの分離に適した培地を考案するために，本種の類縁種を明らかにすることを目指した．解析の結果，ジンベエザメ腸内に棲息する未知ウレアプラズマの最近縁種は， *Ureaplasma ceti* であった．*Ureaplasma ceti* はモリクテス綱の中でも申請者が考案した異質の培地を用いることで分離できたことから, ジンベエザメ腸内に棲息する未知ウレアプラズマも類似した培地で分離できると考えられた．そこで *Ureaplasma ceti* の基礎培地を軸に，ジンベエザメ糞便から未知ウレアプラズマの分離培養を試みたところ, ある添加物を含んだ基礎培地を用いることで，ジンベエザメから未知ウレアプラズマの分離培養に成功した．しかし，増殖スピードが極めて遅い問題点がある．今後，電子顕微鏡を用いた本種の形態観察およびゲノム解析を実施することで本種の特殊性に迫る予定である．最後にジンベエザメ以外の板鰓類が，ジンベエザメから分離された未知ウレアプラズマを保菌するか 6 目 13 種の板鰓類の糞便から抽出した DNA を試料に PCR を用いて評価ところ，本種はジンベエザメのみで保菌が確認された. ジンベエザメと同じテンジクザメ目に分類されるサメにおいても保菌が確認されなかったことから, ジンベエザメは進化の過程で何らかの特異的な生存戦略のためにウレアプラズマと共生していると考えられた．

課題番号	23 若 21

5　研究結果

(1) ジンベエザメ腸内に棲息するウレアプラズマの分子系統学的解析

これまで哺乳類や鳥類といった恒温動物でしかウレアプラズマの分離報告がなく，ジンベエザメのような変温動物からの例がない．そこでジンベエザメ腸内に棲息する未知ウレアプラズマの分離に適した培地を考案するために，本種の類縁種を明らかにすることを目指した．まず本研究では，海遊館および海遊館以布利センターで飼育されているジンベエザメ（n=4）の糞便から抽出した DNA を試料に 16S rRNA クローンライブラリーを作製してウレアプラズマ様の遺伝子断片が検出されるか検証した．30 クローンを解析した結果，ウレアプラズマ様遺伝子配列を 5 クローン分離することに成功した．分離されたクローン間の配列（1435bp）は，100%一致していた．分離クローン配列と最も類似度が高い基準株は，申請者がイルカから分離した新種ウレアプラズマ属細菌である *Ureaplasma ceti* OM1（論文査読中，類似性 92.3%）であり，次点で *Ureaplasma gallorale* ATCC 43346 （類似性 90.9 %）であった．BLAST 解析では，マウスの腸内から検出された Uncultured Ureaplasma sp. clone asv_100_2225（MT967601.1）と 94.1%の相同性を示した．次にクローン配列を基に，モリクテス綱に含まれる 4 科 55 種の 16S rRNA 配列を用いて系統解析を実施した（図 1）．クローン配列は *Ureaplasma* 属に分類され, 最近縁種はイルカの胃内優占種である *Ureaplasma ceti* であった．*Ureaplasma ceti* はモリクテス綱の中でも申請者が考案した異質の培地を用いることで分離できたことから, ジンベエザメ腸内に棲息する未知ウレアプラズマも類似した培地で分離できると考えられた．

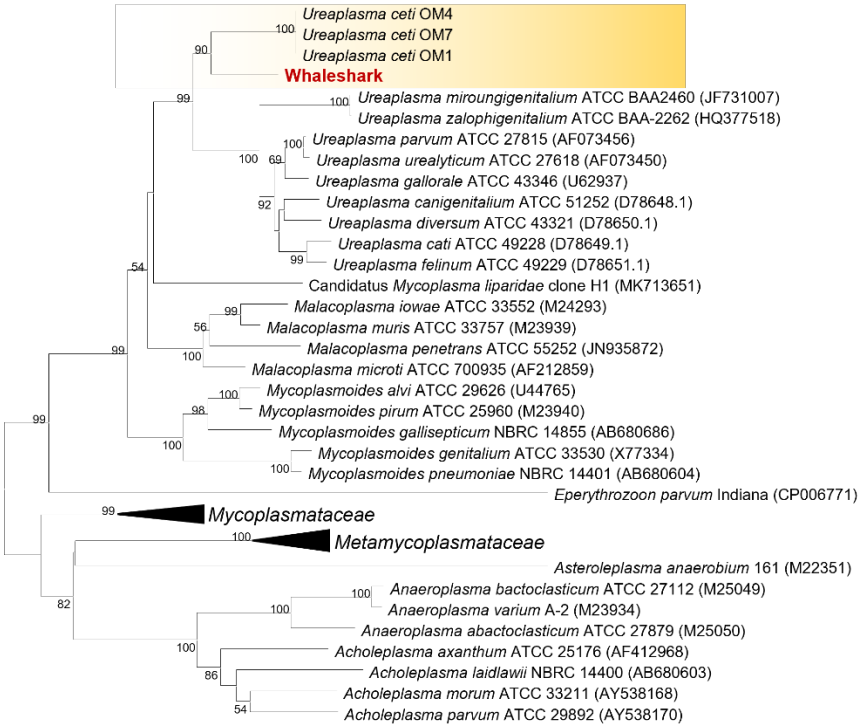


図 1. 16SrRNA を用いた未知ウレアプラズマ分子系統学的分類.
クローン配列とモリクテス綱の 16S rRNA 配列をアライメントした後，ブートストラップ値 1000 回で最尤法を用いて系統樹を作成した．

課題番号	23 若 21

〔5　研究結果（つづき）〕

(2) ジンベエザメ腸内に棲息する未知ウレアプラズマの分離

分子系統解析の結果をもとに, ジンベエザメの糞便から未知ウレアプラズマの分離を行った（図 2）. 度重なる試行錯誤の結果，2024 年 2 月に採材した検体から，ある添加物含んだ *Ureaplasma ceti* の分離培地を用いることで 2024 年 4 月に未知ウレアプラズマの分離培養に成功した. 現在，定量的 PCR を用いて増殖をモニタリングしているが，現時点では継代後，10 倍以上増殖するのに 2 週間以上かかる. 今後安定して増殖することが確認出来たら，本助成金成果をもとに採択された 2024 年度発酵研究所一般研究助成を用いて形態観察と全ゲノム解析を実施する予定である.



図 2. 海遊館でのサンプリング光景

(3) 板鰓類を対象にしたジンベエザメ腸内から分離された未知ウレアプラズマの保菌比較

ジンベエザメ以外の板鰓類が，ジンベエザメから分離された未知ウレアプラズマを保菌するか 6 目 13 種の板鰓類（テンジクザメ目 4 種 ; ジンベエザメ（Rt），オオセ（Oj），シマザメ（Cg），マモンツキテンジクザメ（Ho），メジロザメ目 3 種 ; シュモクザメ（Sm），タテスジトラザメ（Pa），トラザメ（St），ネコザメ目 3 種 ; ネコザメ（Hj），ポートジャクソンネコザメ（Hp），カリフォルニアネコザメ（Hf），カグラザメ目 1 種 ; ラブカ（Ca），ノコギリエイ目 1 種 ; サカタザメ（Rs），トビエイ目 1 種 ; トビエイ（Mt））の糞便から抽出した DNA を試料に PCR を用いて評価した（図 3）. その結果，ジンベエザメと同じテンジクザメ目に分類されるサメにおいても保菌が確認されなかった. 以上より，ジンベエザメは進化の過程で何らかの特異的な生存戦略のためにウレアプラズマと共生していると考えられた. ジンベエザメに共生する本細菌の特殊性を解明することで, 未解明な点の多いジンベエザメの新たな生物学的特徴が見出される可能性がある.

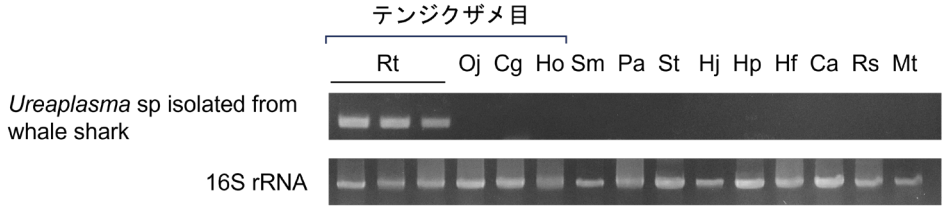


図 3. 板鰓類におけるジンベエザメ腸内から分離した未知ウレアプラズマの保菌調査

申請者がジンベエザメから分離した未知ウレアプラズマおよびイルカから分離した新種ウレアプラズマ（*Ureaplasma ceti*）を含め，既報 9 種のウレアプラズマの 16S rRNA 配列を基にジンベエザメ由来未知ウレアプラズマの特異プライマーを作出した. 16S rRNA は PCR コントロールとして使用した.

課題番号	23若21

6　将来獲得を目指す学内外の競争的資金の種類　（※研究計画書に記載したものを記入すること）

【学外】科研費：挑戦的研究（開拓または萌芽），基盤研究（A）・（B）

財団：発酵研究所（研究助成），化学及び血清療法研究所（研究助成），東京動物園協会（研究助成），昭和聖徳記念財団（研究助成）等

【学内】生物資源科学部学術助成研究費　総合研究，大型研究

7　本研究をもとに申請した外部研究資金及びその獲得状況

氏　　名	申請年度	研 究 種 目	研　究　課　題	採・否
瀬川太雄	2024	研究助成金（財団法人発酵研究所）	ジンベエザメ腸内に棲息する未知ウレアプラズマの分離－ジンベエザメと腸内細菌で築かれる新たな共生関係－	採

8　学会発表等

要旨集の抜き刷り，発表原稿のコピー等及び発表したことがわかるものを添付してください。

発表者名	学会，発表会名等	発表テーマ	発表年月
なし			

9　著書・雑誌論文

著書，雑誌，抜き刷り等を添付してください。コピーの場合は掲載されたことが客観的にわかるものを添付してください。

著者・執筆者	著書名・雑誌名／論文名	巻・号	年月	出版社・発行所
なし				

１０　本研究課題に関するその他の発表（新聞，一般雑誌掲載等）

なし

課題番号	23若21

１１　他の研究への発展

申請者はこれまで *Ureaplasma ceti* には ATP 合成酵素関連遺伝子がないことを発見している．だが *Ureaplasma ceti* は人工培地で自己増殖できることから，これまで報告のない未知経路を駆使して ATP を獲得していることは間違いない．この経路の同定は，これまで分離培養に成功していない植物病原体の *Phytoplasma* 属細菌をはじめ未分離の未知ウレアプラズマを分離培養するヒントになり得る．ジンベエザメ由来未知ウレアプラズマの系統関係と培地構成から，本種も ATP 合成酵素関連遺伝子を欠損していると予想される．本種と *Ureaplasma ceti* のゲノム比較また機能比較を行っていくことで, ATP 合成酵素に代わる未知の機構が同定できると期待される．

１２　その他の成果

なし

１３　本研究課題による発明届の提出及び知的財産権の出願・取得状況

名　　称	知的財産の種類	発　明　者 （考案者・創作者）	権　利　者	出願・登録番号	出願年月日	取得年月日
なし						

※ホームページ等での公開（☑可・☐否）いずれかをチェックしてください。
否の場合は，理由書を別途添付のこと。