納豆菌で養殖魚の夏バテ対策！？

～ 納豆菌S-903株は魚類の水温負荷ストレスを緩和する ～

「茨城県の名物は？」と聞かれると、我が国で古くから健康食品として親しまれている「納豆」と答える方が多いと思います。近年、納豆菌はプロバイオティクス[a]（消化管内細菌叢[b]のバランスを改善することによって宿主の健康に好影響を与える微生物）の1つとしても注目されています[1)]。一方、プロバイオティクスの多くの研究がヒトに対するものであり、農業や畜産、水産等の異分野での活用知見は少なく、その作用メカニズム等は未解明な点が多いです。

こうした中、近年の夏は猛暑が続いており、養殖魚でも魚体重の減少等の夏バテの様な症状がみられ、生産効率に悪影響が出ています。そこで、茨城県の霞ケ浦北浦で盛んに営まれるコイ養殖業で課題となっている「夏バテ対策」に、納豆菌が活用できないか大手納豆メーカーであるタカノフーズ株式会社との共同研究により検討しました。この結果、コイに納豆菌S-903株を食べさせると、ストレスが緩和され、夏バテ様症状の低減につながることがわかりました。これらの成果は、世界的に成長産業と位置付けられる養殖業への活用や納豆菌の新たな機能性開発等につながることが期待されます。

茨城県水産試験場内水面支場
増養殖部長
丹羽　晋太郎
（にわ　しんたろう）

はじめに

世界的な健康志向や日本食ブーム等から魚介類の消費ニーズは高まっています。一方、魚類の生産では、天然の水産資源に依存する漁獲漁業に比べ、近年は養殖技術の発展から計画生産が見込める養殖業に注目が集まっています。また、世界的にみても令和2年の漁業・養殖業生産量は2億1,402 万tとなっており、このうち養殖生産量は約1億2,258 万tで全体の約57.3％を占め、養殖業がタンパク質の供給面で人類に欠かせない重要な位置にあることが伺えます[2)]。我が国においても、海面や陸上における養殖技術の開発や改良、その普及にともない養殖生産量は増加傾向にあり、成長産業の1つと位置付けられています。

一方、養殖魚の飼育環境や経営状況等に着目すると、新たな魚病の発生や飼料価格の高騰等、厳しい状況が散見されており、中でも我々が特に注目したのは地球温暖化等にともない上昇傾向にある水温です。例えばヒトでは、限度はありますが周囲の気温に左右されることなく自ら体温を一定に保つことが可能ですが、一般に魚介類は周囲の水温に依存して生活しており、適温な水域でないと生きていけません。また、魚介類は水温刺激に敏感で、それはヒトと魚介類で感じる1 ℃の温度差には生物学的に大きなギャップがあるとイメージしていただければ良いかと思います。

「暑さ」の影響というと、ヒトでは夏バテや熱中症等がイメージしやすいかと思いますが、実は「暑さ」に対する反応についての科学的な研究事例はヒトや家畜でも少なく、魚介類における研究事例もあまりありません。一般に、「暑さ」は養殖魚の体温上昇を引き起こすことで、生産性や生理機能に悪影響を与えると考えられていますが、これは体内の酸化ストレスを亢進させ、生命活動を維持する代謝等に重要なホルモン分泌を含めた生理機能に悪影響を与えているためと思われます（例えば酸化ストレスの亢進により、DNA損傷、脂質の過酸化、タンパク質変性につながり、細胞死すなわち恒常性の乱れへとつながる）。養殖業でもヒトのように手軽にクーラーや扇風機等が使えれば良いのですが、冷却のコスト面を考えると費用対効果が低い問題があります。また、飼育環境に合わせて養殖品種を変えることも一考ですが外来品種を導入することになる場合が多いため、生物多様性の保全等を鑑みると現実的には難しい状況です。

茨城県に位置する霞ケ浦の夏季の湖内水温も年々上昇傾向にあり、全国1位の生産量を誇るコイ養殖業（令和3年 全国1位の749 t生産、全国シェア36.3％）でも、魚種固有の水温飼育適性等を考えると、生産効率の

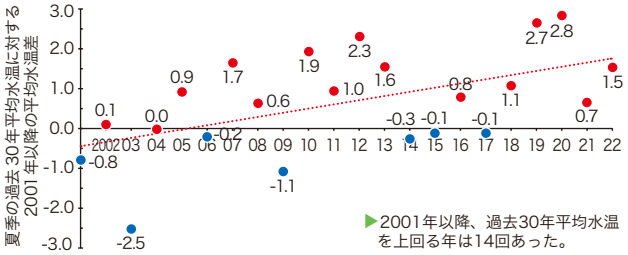

図1 茨城県水産試験場内水面支場桟橋における水深1 mの夏季霞ケ浦平均湖水温の推移（8-9 月の過去 30 年平均水温（1971-2000 年、26.1 ℃）と 2001 年以降の平均水温差の比較）

Information

魚も夏バテするんだ！　というのが最初の強い印象でした。それ自体は当たり前かもしれませんが、かなり水温に敏感で、成長量に大きく差が出るようです。水温上昇による悪影響とその原因を科学的・定量的に示したこと、さらに納豆菌によって大きく改善できることを示したのが、この研究の肝です。

暑さに対する反応についての科学的研究事例は、ヒトや家畜・魚介類のいずれにおいても少ない現状に対し、今回、コイを対象として研究が進められました。温度の違いに対する成長量の違いと、その原因の一端を明らかにされたこと、さらにそれに基づき納豆菌の有効性を示されたことは非常に興味深く、学術・産業への貢献も大きいと考えられます。

世界的に養殖業は成長産業として注目されており、生産量は漁業全体の半分以上（2020年では57%）となっていますが、粗放的[h]な飼育環境では、地球温暖化等の影響により水温が上昇（変動）し、適正飼育が難しくなることが予想されます。茨城県水産試験場内水面支場は霞ケ浦湖畔にあり、同県が全国シェア1位の養殖コイに関する研究を行っていますが、課題となっている夏場の水温上昇による魚への負担解決法が世の中に無い状況でした。タカノフーズ株式会社（小美玉市、納豆の製造販売）から、納豆菌の水産養殖業への有効性を調べる提案が6年前に出され、共同研究が始まりました。

納豆菌は、プロバイオティクスの一つとして近年注目されつつありますが、その作用機構は未解明な部分が多いのが現状です。今般の研究により、その一端が明らかにされました。成果の重要な点を以下に整理します。

（1）魚類を試験対象とする場合、馴れさせることや試験維持管理が難しいがこれをクリアに実施したこと。

（2）納豆菌株の投与方法（凍結乾燥菌体活用）を工夫し、試験魚が反応性を示す条件を見出したこと。

（3）水温負荷ストレス影響について、次世代シーケンサーを活用した消化管内菌叢の解析や二次元電気泳動によるプロテオーム解析、RNA-seq解析等を駆使し、成長量の減少抑制に至る作用機序の一端を遺伝子レベル・タンパク質レベルで発見したこと。

本研究の成果により、成長産業である養殖業への応用や納豆菌の新たな機能性（活用方法）が見いだされ、産業貢献等が期待されます。

なお本稿は、SATテクノロジー・ショーケース2023でプレゼン賞の最高賞となる総合得点賞を受賞された内容を、詳しく解説いただいたものです。

ナビゲーター　つくばサイエンス・アカデミー（SAT）
コーディネータ　渡辺 正信

低下が心配されています（図1）[3)]。

そこで、我々はコイを試験魚とし、春季から夏季の水温上昇をコイの感じる「暑さ」≒「水温負荷ストレス」として考え、近年プロバイオティクスとしても注目されている納豆菌で、この水温負荷ストレスが緩和できないか検討しました。納豆菌には、免疫機能性が高いと考えられているタカノフーズ株式会社の「納豆菌S-903株」を用い、先端技術を駆使し遺伝子レベル・タンパク質レベルにおいて、魚体内で水温負荷ストレスがかかった際に何が起きているのか調べてみました。

コイは納豆を食べるのか？ ～ 納豆菌投与条件の検討 ～

試験を始めるにあたり、試験条件の設定は重要な項目です。そもそもコイが納豆を食べるのかどうかの学術的な知見はありません。そこで、納豆をそのまま食べさせてみたり、エサに納豆を混ぜてみたりと、コイが反応性を示す投与条件を地道に調べてみました。この結果、納豆自体の投与では吐き戻し等で安定した摂餌（せつじ）がみられませんでしたが、再現性良く摂餌した条件は、凍結乾燥した納豆菌S-903株をペレット飼料1 g当たり10^6個となるよう飼料へ万遍なくふりかけて食べさせる方法でした。実際、凍結乾燥菌体の量は極少量で、ペレット飼料100 gに対し、凍結乾燥菌体を0.001 g使用する程度です。納豆菌の投与試験はこの条件の下で進め、日間給餌量は飽食となるよう魚体重の2%に調整し、残餌等の影響を排除するために常に飼育水が入れ替わる流下式水槽を用いました。

また、水温負荷ストレス条件ですが、コイは温暖性の魚種で水温23 ℃程度の水温を心地よく感じています。そこで、水温23 ℃で7日間納豆菌入りの飼料を投与後、水温負荷ストレスとならない23 ℃条件の他、水温負荷ストレスとなる 26 ℃、28 ℃、30 ℃、32 ℃への昇温を500 Wヒーターによりそれぞれ5日間施すこととしました（図2）。

図2 納豆菌 S-903 株投与及び水温負荷ストレス付与の飼育試験イメージ

納豆菌S-903株は コイの水温負荷ストレスを緩和するのか？

水温負荷ストレス付与時の成長量及びストレス指標値の比較

納豆菌S-903株の投与の有無により、水温負荷スト

レス付与時の成長量に興味深い差がみられました。水温28 ℃以上の区画では納豆菌投与区画の方が良い成長量を示しました。例えば水温28 ℃における菌株を食べさせなかった対照区画では水温23 ℃飼育区画に比べ成長量が36.1％にまで減少しましたが、菌株を食べさせた場合は81.4％までの減少に抑制されており、この時、両区画の成長差は約2.1倍にもなりました（図3左図）。

また、成長量に差異がみられたことから、ストレス指標となる血中コルチゾール値を調べてみました。コイの血液は尾静脈から500 μl程度を注射器で採血し、これをヒト用コルチゾール測定キットに供しました。この結果、28 ℃の水温負荷ストレスを与えた区画では菌株投与の有無でコルチゾール値に約67倍の差がみられ、納豆菌S-903株の投与でストレス指標値が大幅に減少することが確認できました（図3右図）。このことから、納豆菌S-903株を食べさせることで、水温負荷ストレスが緩和され、魚体重の減少といった夏バテ様の症状の抑制効果があると考えられました。

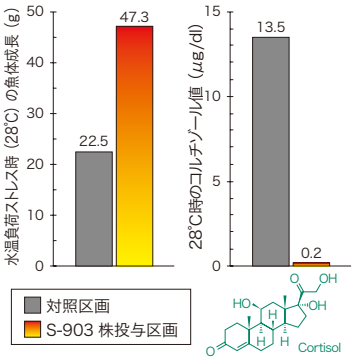

図3 水温負荷ストレス後の区画成長量（左図）及びストレス指標値（右図）の比較

納豆菌S-903株投与時の消化管内菌叢はどうなっているのか？

今般の納豆菌S-903株の投与試験において、我々はコイの消化管内細胞や消化管内細菌叢（消化管内微生物叢）等が投与菌株と相互作用し、水温負荷ストレス付与時の反応を呈したと考えました。そこで、霞ケ浦湖内に網いけす試験区画を設け、夏季の高水温時に菌株投与の有無で消化管内菌叢に差異がみられるのか、次世代シーケンサーを活用して、消化管内菌叢を調べてみました。

この結果、対照区画に比べ菌株投与区画の方が良い成長を示し、また、消化管内内容物の色調にも差異が認められたことから、飼料の消化過程に差異があることが考えられました（図4上図）。消化管内菌叢解析の結果、魚病の原因となるエアロモナス属細菌が減少する等、約12菌種で優占率が変動することがわかりました（図4下図）。飼育環境水はバラエティーに富んだ菌種がみられましたが、消化管内は嫌気的な環境下なので出現菌種は限られます。特に興味深い点は、投薬等と異なり、比較的マイルドに消化管内菌叢の変動がみられた点で、コイにとって負担の少ない反応であると考えられました。投与菌株が消化管内に入る量は極小で、次世代シーケンサーでも検出できない程度の濃度ですので、おそらく納豆菌自身が消化管内細菌叢を変化させるというよりも、コイの消化管内細胞や特定の消化管内の細菌等に対して、細胞表面の糖タンパク質や菌体内成分等を介し働きかけることで、宿主反応が得られたのではないかと考えています。

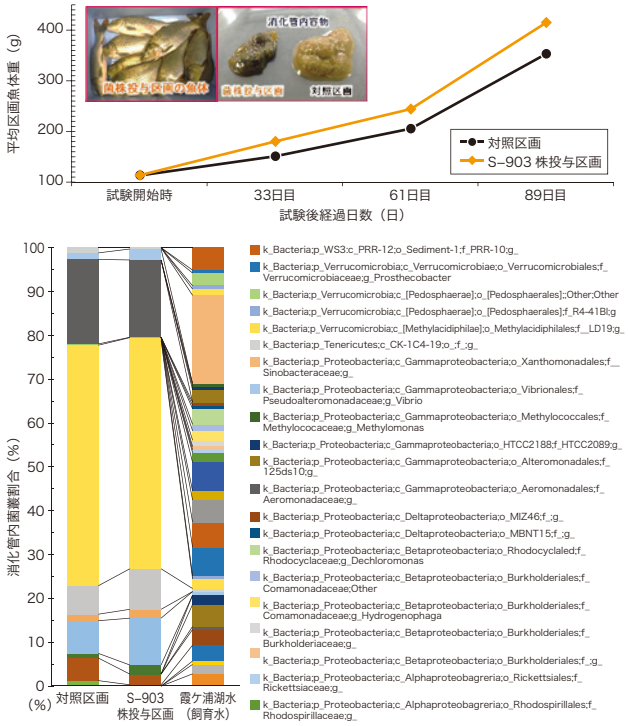

図4 夏季の霞ケ浦湖内での飼育データ（上図）と次世代シーケンサーによる消化管内菌叢の比較（下図）

プロテオーム解析[c]によるタンパク質レベルの網羅的解析

魚体重の変動には魚体を構成する筋肉組織が関与している可能性があることから、筋肉組織を二次元電気泳動によるプロテオーム解析に供してみました。二次元電気泳動は、一次元目として等電点で電荷によりタンパク質を分け、さらに二次元目として電気泳動によりタンパク質を大きさごとに分ける手法です。これによりタンパク質をスポット状に見ることが可能となり、納豆菌S-903株の投与の有無や水温負荷ストレス付与時におけるそれぞれの区画の画像を重ね合わせることで、

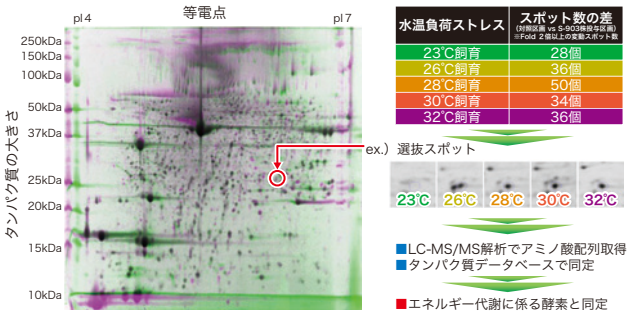

図5 二次元電気泳動によるプロテオーム解析
（紫：納豆菌 S-903 株投与個体、緑：対照区画）

発現/消失するタンパク質が発見できます。

この結果、魚体重の変動と同様に水温28 ℃区画において、最多となる50スポットの変動が確認できました（図5）。そこで、特に顕著な発現/消失を示したスポットについて、LC-MS/MS解析[d]に供し、アミノ酸配列を調べ、得られた部分配列をタンパク質データベースと照合した結果、エネルギー代謝に関与するクレアチン代謝[e]に係る酵素であると判明したことから、菌株投与によりエネルギー代謝が調整されていることが考えられました。

トランスクリプトーム解析[f]による遺伝子レベルの網羅的解析及び注目因子の発見

これまでのタンパク質レベルでの解析から、納豆菌S-903株の投与効果はエネルギー代謝に寄与することが考えられましたので、タンパク質が合成される前の段階で、どのような因子が関与しているのかを網羅的に調べるため、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析の一種のRNAシーケンス解析（RNA-seq解析）により、どのような遺伝子が発現しているのか調べてみました。

通常、タンパク質は遺伝情報となるDNAがmRNAに転写され、このmRNAが翻訳されることでアミノ酸となり、アミノ酸が繋がりタンパク質が合成されます。細胞が外部刺激等を受け、これに応じ遺伝子情報を基に様々なmRNAが外部刺激依存的に発現することにより、タンパク質を合成しているとイメージいただければと思います。

そこで、菌株投与の有無と水温負荷ストレス付与時のmRNA発現量を調べた結果、特に28 ℃区画において、13の因子について発現が促進され、57の因子の発現が抑制されていました。このことから、菌株投与区画では対照区画に比べ発現する因子が約4.4倍抑制側に偏っていることがわかりました。抑制された因子は、主に細胞骨格やエネルギー代謝に係る因子であり、菌株投与により高水温という異常環境下で無駄なエネルギーを使っていないことが考えられました。

さらに、変動した因子の遺伝子情報の中から、近年、糖尿病やメタボリックシンドローム等の重要因子と考えられている「C1q/TNF-Related Protein 3（CTRP3[g]）」[4]を発見しました。そこで我々は、CTRP3を特異的に検出する手法を開発し、水温負荷ストレス付与時の遺伝子発現量をモニタリングしたところ、CTRP3は納豆菌S-903株の投与時のみ、水温変動依存的に発現することがわかり、これが水温負荷ストレス緩和に係る注目因子であると考えました（図6）。

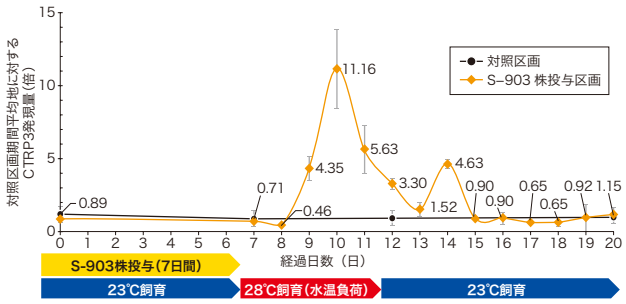

図6 水温負荷ストレス時におけるCTRP3発現量の経時モニタリング

まとめ

我々は養殖コイを対象に、①納豆菌S-903株の投与により、水温負荷ストレスが緩和され、体重減少等の夏バテ様症状が抑制されること、②この反応は水温依存的に発現するCTRP3等を介し、遺伝子レベル・タンパク質レベルでエネルギー代謝等を上手に調整している可能性を明らかにできました。

今後、養殖業は地球温暖化等の影響にともない過度な水温負荷ストレスに晒される機会が増加すると予想されます。そこで、今回の成果を基に納豆菌を活用した新たな「夏バテ対策」となるような養殖技術開発やCTRP3等を指標とした新たな機能性納豆菌株の探索等が期待されます。我々も暑さに負けず、技術の実用化に向けて研究を進められればと考えています。

本研究は、茨城県水産試験場とタカノフーズ株式会社との共同研究成果です。

<用語>
[a] プロバイオティクス：宿主に有益な効果を与える生きた微生物
[b] 菌叢（きんそう）：体内の特定部位に生息する微生物（細菌等）の集まり
[c] プロテオーム解析：二次元電気泳動等により、生物の全てのタンパク質の構造や機能を網羅的に解析する方法
[d] LC-MS/MS解析：液体クロマトグラフ質量分析計により、アミノ酸の組成を分析することで不明なタンパク質を調べる方法
[e] クレアチン代謝：筋肉等でのエネルギー調整に関わる代謝経路
[f] トランスクリプトーム解析：次世代シーケンサー等を活用し、遺伝子から作られる転写産物（mRNA等のトランスクリプトーム）を網羅的に解析する方法
[g] CTRP3：C1q/TNF-Related Protein 3の略で、近年は糖尿病やメタボリックシンドローム等に関わる因子として注目される脂肪細胞から分泌される生理活性物質
[h] 粗放的：自然に近い環境で、労働力やお金をかけないで行うこと

<参考文献>
1）Fuller, R.（1989）Probiotics in Man and Animals. Journal of Applied Bacteriology, 66, 365-378.
2）令和4年度水産白書 水産庁, 第1部, 第4章, P146−147
3）令和3年漁業・養殖業生産統計
4）Ying Li, et al. (2017) ,C1q/TNF-Related Protein 3 （CTRP3） Function and Regulation, Compr Physiol. Jun 18; 7 (3) : 863–878.

<特許情報>
【特許第5090754号】免疫に対する機能性を高めた納豆及び抗アレルギー用組成物
【特開2022-165041】経口投与用組成物及びその使用
【特開2022-169087】抗ＳＡＲＳコロナウイルス−２用組成物及びその製造方法

<連絡先>　s.niwa@pref.ibaraki.lg.jp