

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	Muhammad Fariz Zahir Ali
審査委員	主査 三浦 猛
	副査 橘 哲也
	副査 深田 陽久
	副査 松本 由樹
	副査 三浦 智恵美

論文名 Insect-derived functional polysaccharides: A potential alternative for disease control in fish and shellfish  
(昆虫由来機能性多糖：魚介類疾病防除物質としての可能性)

### 審査結果の要旨

水産養殖は、この30年間世界的に著しく発展し、人類への食料供給に大きく貢献している。しかしながら、この発展に伴う、様々な問題も顕在化しつつある。

マダイやブリをはじめとする肉食性魚介類の給餌型の養殖では、飼料の主原料として天然魚由来の魚粉が使用されており、天然資源に負荷をかけながら生産が行われている。この状況を解決するために、飼料中の魚粉を削減する取り組みが数多く行われている。これらの取り組みの一つとして、廃棄物から生産できる昆虫の飼料原料としての利用が世界的に注目されている。

昆虫の飼料化の取り組みの中で注目されるのが、昆虫の持つ動物への機能性である。特に魚介類に対して昆虫は、摂食性の増大、成長促進および免疫賦活化の機能が認められ、魚介類の養殖にとって多くのメリットをもたらすことが予想される。本研究は、昆虫の持つ動物に対する機能のうち、免疫賦活化作用に焦点を絞り、その原因物質の同定と魚類およびエビ類への分子レベルでの作用機序の解明を目指した。

多くの昆虫種は、マウスのマクロファージ由来細胞株 RAW264.7 細胞に対する一酸化窒素産生能 (NO 活性) を持つ。この NO 活性は、マクロファージの殺菌能力を示しており、免疫賦活化能の指標となる。そこで、水産養殖への利用が可能と考える昆虫種であるカイコ (*Bombyx mori*)、ヤママユ (*Antheraea yamamai*)、アメリカミズアブ (*Hermetia illucens*) から、RAW264.7 細胞での NO 活性を指標として免疫賦活化物質の単離を試みた。各昆虫種の水抽出物をエタノール沈殿、ゲル濾過および陰イオンクロマトグラフィーによる精製工程後、得られた NO 活性陽性分画は、カイコでは分子量  $1.15 \times 10^6$  da、ヤママユでは  $3.15 \times 10^5$  da、そしてアメリカミズアブでは  $1.47 \times 10^5$  da の分子量であり、ガスクロマトグラフィー質量分析系による解析の結果、それぞれ 9 個、9 個および 10 個の単糖から構成される酸性多糖であることが明らかとなった。これらの多糖を、カイコ由来のものをシルクロース-BM、

ヤマモユ由来のものをシルクロース-AY およびアメリカミズアブ由来のものをディプテロース-BSF と命名した。RAW264.7 細胞を用いた生体外培養による解析の結果、これらの多糖は、炎症系サイトカインの発現を促進すること、2型および4型のトル様受容体を抑制すると、これら多糖による NO 活性が有意に減少したことから、これらの昆虫由来機能性多糖類は、トル様受容体シグナル経路を介してマクロファージでの各種サイトカインの分泌を促進することが示唆された。また、RAW264.7 細胞では、これら昆虫由来機能性多糖類の暴露により I $\kappa$ B が分解され、NF- $\kappa$ B が核に移動することが確認された。これらの結果から、この昆虫由来機能性多糖は、自然免疫系を活性化することにより、宿主の免疫機能を向上させることが示唆され、水産業や畜産業における機能性資料添加物として利用することが可能であると考えられた。

昆虫由来機能性多糖の魚類に対する免疫賦活化作用を分子レベルで明らかにするために、モデル生物であるメダカ (*Oryzias latipes*) を用いて解析を行った。シルクロース-BMまたはシルクロース-AYを経口投与したメダカに、魚類エドワジェラ症の原因菌である*Edwardsiella tarda*を浸漬により強制感染させた。シルクロース-AYおよびシルクロース-BMの経口投与は、供試魚の腎臓における*E. tarda*の感染菌数を有意に低下させるとともに、供試魚の死亡率を有意に低下させた。この結果は、シルクロース-AYおよびBMが、病原菌の感染を抑え、耐病性を向上させたことを示している。シルクロース-AYおよびBMの分子レベルでの作用機序を調べるため、シルクロース投与によるメダカの腸と肝臓での遺伝子発現変化をDNAマイクロアレイ法および次世代シーケンサーによるRNAシーケンス法により調べた。遺伝子オントロジーおよびパスウェイエンリッチメント解析の結果、シルクロースAYおよびBMは、病原体の認識、補体および血液凝固系、抗菌ペプチド、酵素活性、食食活性、オプソニン化、上皮細胞の細胞間結合などに関与すると考えられる遺伝子の発現を誘導することが明らかとなった。

さらに、世界で最も盛んに養殖されている甲殻類であるバナメイエビ (*Litopenaeus vannamei*) を用いて、シルクロース-BMの効果を検証した。バナメイエビへのシルクロースの経口投与後、病原性の*Vibrio penaeicida*による強制感染試験を行ったところ、シルクロース投与により、*V. penaeicida*に対する耐性が有意に向上した。また、シルクロース投与によるバナメイエビ免疫系での遺伝子発現への影響を、メダカと同様RNAシーケンスによって解析したところ、無脊椎動物でトル受容体の活性化に重要なサイトカインであるspätzle遺伝子の発現上昇が認められたことから、バナメイエビに関してもシルクロースの免疫賦活化にはトル受容体シグナル系が関与していることが示唆された。

以上本論文では、昆虫類3種から機能性多糖の単離・同定を行うとともに、それら多糖類の分子レベルでの免疫賦活化機構の一部を*in vivo*および*in vitro*の両面から明らかにした。本論文で示した昆虫由来多糖の機能は、水産養殖で大きな問題の一つとなっている生産物の安全な疾病対策に利用できる可能性が極めて高いものと考えられる。

昆虫は、持続可能な養殖を実現する重要な飼料原料としての利用が世界的に期待されている。本論文は、飼料原料としての昆虫の付加価値を高め、その普及に大きく貢献することができる極めて価値の高い内容である。

本論文に関する公開審査会は、令和3年7月28日にリモートシステムを利用して開催され、申請者の論文発表と適切な質疑応答が行われた。引き続いて行われた学位論文審査会で、本論文の内容を慎重に審議した結果、審査委員全員一致して、Muhammad Fariz Zahir Aliに対し、博士（農学）の学位を授与するに値するものと判定した。