

特異な草食性魚類の腸管内微生物の探索

秋吉英雄¹・川向 誠² 生物資源科学部 生物科学科¹・生命工学科²

目 的

硬骨魚綱条鰭亜綱新鰭区は、系統学的にカライワシ下区、ニシン・骨鰈下区、正真骨下区の3下区に分類されるが、その消化管形態は系統的に異なっている (Akiyoshi and Inoue 2004)。系統学的に最後に分岐した正真骨下区は、一般に胃・幽門垂・小腸・大腸の形成を認めるが、正真骨下区に属する草食性魚類の一部には胃の形成が無く、長い小腸を有している魚種を少数認める (Akiyoshi and Inoue 2005)。このような魚種の消化機能は、食物とともに摂取された細菌などの微生物を小腸内に取り込み、微生物 (細菌) により消化された有機物質を小腸上皮より吸収していると推察される。

腸管内微生物は各種動物と微生物との共生生活、特に相利共生は反芻動物の胃、シロアリの腸、ヒトの消化管に代表されるように古くから研究対象となっており、近年では、腸内細菌はヒト免疫の成立に不可欠とされ、アレルギーの発現等に関するめざましい研究の進歩も見られる。魚類由来の様々な生理活性物質の中にはヒトの生存に欠かすことができない有用で有効な各種成分 (医薬品: 抗腫瘍物質・免疫活性蛋白, 栄養物質, 抗酸化物質, 化粧品素材など) を含んでいる。近年では、これらの物質の多くが魚類の腸管内微生物の働きによる代謝産物であることが明らかとなってきた。

魚類における腸管内微生物の研究は、プロテアーゼ等の消化酵素, 高度不飽和脂肪酸 PUFA, プロバイオティクス的な機能を有する乳酸菌および機能性タンパク質 (免疫タンパク質, 抗菌タンパク質等) を産生する細菌などが報告されている。一方, 草食性魚類の腸管内には, 海藻および珪藻分解細菌が生息することが推察される。水溶性食物繊維である海藻 (アルギン酸) を分解する細菌の研究 (Kawamoto et al. 2006) は認めるが, その他の細菌に関する研究報告例は非常に少ない。

今回, これまで微生物の検索がほとんど行われてこなかった草食性魚類に注目し, 形態学的手法により消化管を顕微鏡および走査型電子顕微鏡によって詳細に検討するとともに, 分子生物学的に腸管内の細菌を培養し, 単離するとともに, 直接的に DNA を増幅する手法より, 16S rRNA 領域の配列を決定し, 微生物類の同定を試みた。

材料と方法

沖縄県西表島のサンゴ礁域の岩上に生息し, 珪藻食性を有するヨダレカケ (*Andamia tetradactyla*, 正真骨下区ギンポ亜目イソギンポ科) の消化管を材料に使用した。ヨダレカケは, 採集後速やかに固定を行って, 消化管組織の形態学的検討に供するとともに, 生きたヨダレカケを空輸し, 採集後3日以内の腸内の細菌を培養して, 分子生物学的検討に供した。

顕微鏡および走査型電子顕微鏡による消化管組織の試料作成

動物は, 速やかに開腹し消化管を採取, 4% パラホルムアルデヒド (0.1M 燐酸緩衝液 pH7.4) にて浸漬固定を行った。固定後の消化管は, 早期に管腔を開いて再度固定を行った。固定された材料は, アルコール系列によって脱水後, キシレン透徹, パラフィン包埋を行い, 4 μ m の切片を作成後, H・E 染色, 特殊染色を行った。

走査型電子顕微鏡の試料は, 口腔および肛門側から, 2% グルタルアルデヒド (0.1M 燐酸緩衝液 pH7.4) を灌流して固定後, 再度同液にて浸漬固定を行った。固定後の組織は, 細切し, オスミウム酸-タンニン酸 (O-T-O) 処理, アルコール系列による脱水・T ブチルアルコール乾燥を行った後に, 白金-パラジウムを蒸着し, 走査型電子顕微鏡にて観察した。

腸内細菌の培養および 16S rDNA による細菌の同定

ヨダレカケは水中麻酔後, 70% アルコールで湿らしたガーゼで魚体を拭いて消毒後, クリーンベンチ内で開腹, 速やかに小腸をシャーレ内に摘出した。小腸内容物は小腸とともにハサミによって細かく細切し, 培養に供した。

滅菌済み希釈液は生理食塩水 (0.9% NaCl) と海水希釈液 (L-システイン塩酸塩 5g, 寒天 1g, 50% 海水 1000ml, pH7.5 (for 1L)) を使用した。培養は好気培養と微好気培養, 嫌気培養の3つを行った。培地は LB 寒天培地, Zobell 培地, Mac CONKY-glucose 寒天培地, 乳酸菌培地として MRS Broth OXOID (以下 MRS 培地) を用いた。LB 培地, MRS 培地は滴下する生理食塩水 (希釈液) 濃度を, 原液 (10^0), 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , とし, Mac CONKY-glucose 寒天培地は滴下する懸濁液の濃度を原液 (10^0), 10^{-1} としてそれぞれ 100 μ l ずつ培地に滴下し菌を植え付けた。培地は 35 $^{\circ}$ C に置き, コロニーの出現を観察

した。その他の培地に滴下する海水希釈液濃度は、好気培養では原液 (10^0), 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , を各培地に100 μ lずつ滴下し、微好気培養、嫌気培養では、腸管を1回洗浄した懸濁液および1回洗浄した腸管を別の希釈液へ入れ懸濁した懸濁液の各培地に100 μ lずつ滴下した。微好気、嫌気状態はタッパー中にアネロパック（三菱ガスミカル社）を入れて蓋をし、ビニールテープで蓋の外周をさらにテーピングを行って密閉状態を作成した。好気培養、微好気培養、嫌気培養の培地は25 $^{\circ}$ Cに置き、コロニーの出現を観察した。

単離培養用の培地に出現したコロニーは、滅菌済み爪楊枝の先端に少量附着させ、液体培地へ懸濁した後、35 $^{\circ}$ Cに一晩置き、菌体の増殖を確認し、ゲノム抽出を行った。これを鋳型にしてPCRを行い、大腸菌 (*E.coli*) 用16S rRNA プライマー F518 および F907 を用いて、16S rDNAを増幅した。増幅されたDNAを精製し、pT-7 blue (T vector) とライゲーションし、これを用いて *E. coli* 株 DH5 α を形質転換した。形質転換体大腸菌を X-gal を含む LA 培地に適量蒔き一晩置いた。形質転換されたコロニーからプラスミドを抽出し、RNase 処理を行い、シーケンスを行ない、16S rDNA 配列を決定した。

結 果

光顕および走査型電子顕微鏡による消化管の観察

ヨダレカケ消化管起始部の膨大部組織は、複合胞状腺状絨毛嚢を認めた。絨毛は微絨毛を持つ単層円柱上皮、杯細胞および固有層からなる粘膜が観察され、通常の胃に見られる胃腺および発達した筋層は認めなかった。消化管中間部の小腸は絨毛の発達を認め、杯細胞および微絨毛を認めた。大腸では、微絨毛および発達した筋層を認めた。小腸の管腔内に球形態の珪藻が充満して観察され、珪藻表面には繊毛を有する細菌が付着している他、複数の細菌を観察した。

16S rDNA による腸管内細菌の同定

腸内細菌は、好気条件、微好気条件、嫌気条件にて培養を行い、好気条件では3種類、微好気、嫌気条件よりは5種類の菌株を得た。菌体を単一化し、DNAを抽出し、16S rDNAを決定した。好気条件より得られた未知菌株は *Vibrio* sp.V859, *Vibrio* sp.V639, *Vibrio harveyi*, *Pseudoalteromonas* sp. JL-S1 と高い16S rDNAとの相同性を示した。嫌気条件から単離された菌ではアガロースゲル分解細菌が見られ、*Vibrio alginolyticus* と98%の高い相同性を示した。

考 察

ヨダレカケ消化管内より、珪藻分解性細菌を一群に持つ *Pseudoalteromonas* 属やアガロースゲル分解細菌である *Vibrio alginolyticus* 等海水環境中に生息する細菌が単離されたことは、ヨダレカケの食物である珪藻の分解には海洋中の珪藻分解性細菌を利用している可能性が高いことが推察された。ヨダレカケの食物消化は、食物と共に摂取された細菌による受動的な消化と考えられ、環境中の細菌に依存している可能性がある。

一般に、有胃魚は胃における酸性の消化液で食物に付着した微生物を殺菌することで、消化管内の独自の微生物叢を維持する事が知られている。腐食性の食性を有するカライワシ下区の魚種では、食物と共に摂取された微生物が産生するプロテアーゼによって消化を行っていると考えられる。正真骨下区草食性魚類と同じ消化管形態であるニシン骨鰈下区は、外界の微生物を腸管内に保持することで消化を行い、非常に長い小腸で吸収を行っていると考えられる。正真骨下区は多岐にわたる食性に対応するため、胃による機械的消化と胃、幽門垂、小腸から分泌される消化酵素による化学的消化を獲得し、外環境に生息する微生物の利用が不要となったと考えられる。

魚類における腸管内微生物の研究の方向性は、プロバイオティクスの開発が主眼であり、ブリ、タイ、フグなどの食用魚における検討が中心ある。今回焦点をあてた完全草食魚類の内臓の研究は世界的にも非常に少なく、腸管内細菌の検討例もない。今回の学部長裁量経費による本研究テーマは、草食性魚類の内臓の解剖・組織学的成果および新たな腸管内細菌の発見などの学問的成果に加え、将来的にヒトの疾病および健康維持に関連する応用的側面に発展する可能性があると考えられる。

引用文献

- Akiyoshi H, Inoue A (2004) Comparative histological study of teleost livers in relation to phylogeny. *Zoological Science*, 21:841-850.
- Akiyoshi H, Inoue A, Fujimoto M (2005) Comparative immunohistochemical study of C-RFamide localization in teleost guts in different saline habitats. *Zoological Science*, 22:57-63.
- Kawamoto H, Horibe A, Miki Y, Kimura T, Tanaka K, Nakagawa T, Kawamukai M, Matsuda H (2006). Cloning and sequencing analysis of alginate lyase genes from the marine bacterium *Vibrio* sp. O2. *Mar. Biotechnol.* 8:481-490