

珪藻・海藻分解性細菌の生理学・生化学的特性および有用遺伝子の探索

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

緒 言

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*, ギンボ亜目イソギンボ科) は、系統学的に正真骨下区に属する硬骨魚類の仲間であるが、特徴的な消化管を有している。一般に消化管形態は系統学的に異なっており、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, 2004, 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・分解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。

魚類における腸管内微生物の先行する研究は、食用となる有用魚で多く、プロテアーゼ等の消化酵素を分泌する細菌、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、草食性魚類の消化管内微生物として、海藻および珪藻分解細菌が生息することが推察されるが、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珪藻食性魚類であるヨダレカケに注目し、消化管を顕微鏡および走査型電子顕微鏡によって組織学的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て、単離し、DNA の配列を明らかにするとともに、生理学的・生化学的特性を検討した。

材料と方法

ヨダレカケは、採集後速やかに心臓より環流固定を行って、消化管組織の形態学的検討に供するとともに、採集後の翌日にヨダレカケは空輸され、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。

顕微鏡及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 (0.1 M 燐酸緩衝液 pH 7.4) 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 μm 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 (0.1 M 燐酸緩衝液 pH 7.4) 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 16SrDNA 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, 50% 海水 1000 ml, pH 7.5 (for 1 L)) を使用した。培養は微好気培養と嫌気培養の2種類で行った。培地は Zobell 培地, Mac Conky-glucose 寒天培地, M9 培地を用いた。腸懸濁液としてそれぞれ 100 μl ずつ培地に滴下し菌を植え付けた。培地は 30°C に置き、コロニーの出現を観察した。培地に滴下する海水希釈液濃度は、海水生理食塩水 100% 濃度と 50% 濃度で、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 μl 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 (三菱ガスケミカル社) 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。微好気培養、嫌気培養の培地は 30°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付着させ、液体培地へ懸濁した後、30°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 16 SrRNA プライマーを用いて、16SrDNA を増幅した。増幅された DNA を精製し、pT-7blue (T vector) とライゲーションし、これを用いて *E. coli* 株 DH5α 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、Big Dye terminator を用い、シーケンスを行ない、16SrDNA 配列を決定した。塩基配列の決定は総合科学支援センター遺伝子機能解析分野のアプライド社製 ABI310 を用いた。

結 果

光顕および走査型電子顕微鏡による消化管の観察

ヨダレカケ消化管は、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。小腸の管腔内に球状形態の珪藻が充満して観察され、珪藻表面には絨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。

16SrDNA による腸管内細菌の同定

腸内細菌は、好気条件、嫌気条件にて培養を行い、好気条件ではオレンジ色、乳白色のコロニーの出現を観察し、嫌気条件よりは赤色、オレンジ色、乳白色のコロニーの出現を観察した。それぞれのコロニーの菌体を単一化し、DNA を抽出し、PCR 法により 16SrDNA を増幅させ、ベクターにクローン化した後に、16SrDNA を決定した。3 種類の菌株について、その 16SrDNA を決定することに成功した。その結果、赤色のコロニーより単離した菌は *Bacillus* 属の細菌で、オレンジ色のコロニーの細菌は *Schwanella* 属の細菌で、乳白色のコロニーの細菌は *Vibrio* 属系の細菌であることが判明した。嫌気条件下で単離した *Schwanella* 属や *Vibrio* 属の細菌は好気的な条件では生育できなかった。単離した 3 種は昨年度単離した *Vibrio* 属のようなアガロース分解能はなく、またフコイダン含有培地上では顕著な分解能力を示さなかった。

考 察

昨年度の成果により、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。今年度の結果では、*Bacillus* 属の細菌、*Schwanella* 属の細菌、*Vibrio* 属系の細菌を単離した。このことは、ヨダレカケの腸内には多種多様な菌種が存在し、それらの菌がセルロースやアガロースを分解する役割を担っていると考えられた。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。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。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。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
- 秋吉英雄, 川向 誠, 特異な草食性魚類の腸管内微生物の探索, 島根大学生物資源科学部研究報告第 12 号, p. 67-p. 68

謝 辞

本研究を遂行するために協力を得た木村将士, 外山京, 堀内富貴, 各氏に感謝する。