

海洋性資源の有効活用を目指した海藻食性動物の腸管内に棲息する微生物の探索

川向 誠¹・秋吉英雄² (生物資源科学部 生命工学科¹ 生物科学科²)

目 的

海水域に生息する海藻食性動物は、アワビやサザエ等の軟体動物やウニをはじめとした棘皮動物、一部の硬骨魚類等無脊椎動物から魚類まで、海洋生態系に広範に生息しており、海洋循環サイクルにおける消費者としての重要な位置を担っている。

これらの動物は、海藻を分解する消化酵素を分泌するのではなく、腸管内に海藻分解微生物を有している。従って、共生環境を維持する腸管内環境の調節を構成する消化器系臓器を有しており、特有の組織構築が形成されているが、消化器官の組織学的特性と腸管内微生物に関する研究報告は非常に少ない。特に、海棲無脊椎動物の腸管に関する報告は、ほとんど存在しない。

これまでに明らかにされた硬骨魚類の正真骨下区の魚種では、一般に胃・幽門垂・小腸・大腸の形成を認めるが、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するのに適した消化管構築を有していると推察される。

魚類における腸管内微生物の研究では、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。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) を含んでおり、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。

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、これまで行ってきた海藻食性魚類の腸管内微生物の探索技術を利用して、これまでに検索がほとんど行われてこなかった海藻食性動物 (軟体動物、硬骨魚類) に注目し、形態学的手法により消化管を光顕および走査

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、16sRNA 領域の配列を決定し、有用微生物類の探索を試みた。

材料と方法

硬骨魚類はワタカ、メジナ、ヨダレカケ、軟体動物は、アメフラシ、腹足綱キバウミニナの動物種を材料とした。それぞれの動物は、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、一部の魚種では、消化管を無菌的に取り出した後、腸内の細菌を培養して、生化学および分子生物学的検討に供した。

光顕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 (0.1M 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

ワタカ、メジナ、ヨダレカケは水中麻醉後、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 1000ml, pH7.5/1L) を使用した。培養は好気培養と微好気培養、嫌気培養の3種で行った。培地は LB 寒天培地、Zobell 培地、Mac-Conkey 培地、乳酸菌培地、M9 培地、フコイゲン含有 LB 培地を用いた。培地は 30 $^{\circ}$ C-35 $^{\circ}$ C に置き、コロニーの出現を観察した。好気培養、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。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付着させ、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、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た。ABI310を用いシークエンスを行ない、16SrDNA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

ワタカ、ヨダレカケは消化管起始部の膨大部組織は、小腸様の上皮で、胃腺を欠いていた。メジナは胃を有しており、組織学的に胃腺を認めた。アメフラシおよびキバウミナナの消化管は、単純なU字様の形態を示し、胃、小腸という明瞭な区分は認められず、特異な組織学的特性を示した。ワタカおよびヨダレカケの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。

腸内細菌の観察

ワタカの腸内細菌は乳白色のコロニーを形成し、電子顕微鏡観察の結果では、桿菌で、グラム陰性菌であることが分った。メジナの腸内細菌は乳白色や桃色のコロニーを形成し、電子顕微鏡観察の結果では、桿菌のグラム陽性菌と短桿菌のグラム陰性菌の少なくとも2種類が観察できた。ヨダレカケの腸内細菌は乳白色、オレンジ色、赤色のコロニーを形成し、乳白色、オレンジ色の菌はグラム陰性菌、赤色の菌はグラム陽性菌であった。

ヨダレカケの腸内細菌は16SrDNAを決定した。16SrDNAとの相同性の解析の結果、赤色の菌は*Bacillus firmus*に近い菌種で、乳白色の菌は*Vibrio* sp. FLIU3に近い菌種で、オレンジ色の菌は*Shewanella* sp. Fun-119に近い

菌種であった。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。フコイダンを積極的に分解している菌は見いだせなかった。

考 察

軟体動物アメフラシ、キバウミナナおよび硬骨魚類ワタカ、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、環境中の微生物に依存している可能性がある。

今回観察した、海藻食性動物の消化管は、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。

魚類における腸管内微生物の研究は、乳酸菌の探索による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。今回焦点をあてた海藻食性動物である軟体動物および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、海藻食性動物の内臓の解剖・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, 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: 481-90

謝 辞

本研究を遂行するために協力を得た外山京、堀内富貴、両氏に感謝する。