

魚類の腸内細菌叢の探索

静岡県立沼津東高等学校

2年 岩附利英 金澤貴弘 小笠原貴翔 細谷健人 土屋花蓮

1 動機

本研究では、先例の少ない深海魚の腸内細菌叢(腸内に生息する細菌の集合体)の調査を行い、新たな知見や深海魚由来の新規有用菌を求めた。また、駿河湾では深海魚漁が行われており、サンプルとして不可欠である新鮮な深海魚を入手することができるという地元の特長を活かした。

2 背景

静岡県は、日本一の深さを誇る駿河湾に面している。駿河湾は魚の宝庫であり、多くの魚類が水揚げされている。また、沼津市は沼津港や戸田港を有し、水産業が盛んな町である。

これまでに多くの魚類の腸内細菌が分離されているが、深海魚の腸内細菌・腸内細菌叢に関する先行研究は少ない。

地元の産物である深海魚の腸内細菌叢を調べ、先行研究にある浅海魚の腸内細菌叢と比較することで、両者の共通点・相違点を発見することを目的とした。さらに、新たな分離源である深海魚の腸内容物から有用菌の分離・試験をしようとした。

3 実験

(1) 魚類の腸内細菌の培養・分離・試験

培養は油脂分解菌を分離対象とする培地(油脂分解菌分離用培地)と非選択培地(PYGB 寒天培地、1/20PYGB 寒天培地)を用いて行う。単離後に活性試験を行う。

ア 手順

- (ア) 魚を氷水漬けの状態、沼津港・戸田港から学校へ輸送する。
- (イ) 魚の体表を70%エタノールで殺菌する。
- (ウ) 無菌条件下で検体を開腹し腸管から腸内容物を取り出し、スクリーン管に入れる。使用するバット・解剖はさみ・ピンセットなどの器具をオートクレーブで滅菌する。また、別の検体を扱う際には70%エタノールで器具を殺菌・洗浄する。
- (エ) 採取したサンプルを、オートクレーブ滅菌した生理食塩水(0.9%塩化ナトリウム水溶液)で10倍に希釈する。これを菌液とする。
- (オ) 画線培養法を用いて、菌液を油脂分解菌分離用寒天培地¹(表1)とPYGB寒天培地(表2)、1/20PYGB寒天培地(表3)にそれぞれ塗布する。
- (カ) 菌液を塗布した培地を、インキュベーター(10℃・40℃)に入れ、72時間培養する。
- (キ) 油脂分解菌分離用寒天培地で生育した株を油脂分解菌候補株とする。コロニーを単離後、油脂分解活性試験²を油脂分解菌候補株に関して行う。油脂分解活性試験では、油脂分解活性試験用寒天培地(表4)に油脂分解菌候補株を植える。その後、生育したコロニー周辺の白濁の有無を確認し、白濁が確認された油脂分解菌候補株を陽性とする。PYGB寒天培地と1/20PYGB寒天培地では生育したコロニーの数をそれぞれ測定する。

表 1 油脂分解菌分離用寒天培地組成

Composition	g/L
Salad Oil	2.0
KH ₂ PO ₄	0.5
K ₂ HPO ₄	1.0
KCl	0.3
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.2
NH ₄ Cl	1.0
Agar	15.0
pH7.0	

表 2 PYGB 寒天培地組成

Composition	g/L
Trypticase Pepton	10.0
Soy Pepton	5.0
Beef Extract	2.4
Yeast Extract	2.0
Glucose	1.0
Agar	15.0
pH7.0	

表 3 1/20PYGB 寒天培地組成

Composition	g/L
Trypticase Pepton	0.5
Soy Pepton	0.3
Beef Extract	0.1
Yeast Extract	0.1
Glucose	0.1
Agar	15.0
pH7.0	

表 4 油脂分解活性試験用寒天培地

Composition	g/L
Tween80	10.0
Trypticase Pepton	10.0
NaCl	5.0
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1
Agar	20.0
pH7.0	

イ 検体魚種

検体には、スミクイウオ (*Synagrops japonicus*)、ユメカサゴ (*Helicolenus hilgendorfi*)、オオメハタ (*Malakichthys griseus Döderlein*) の 3 種の深海魚とヒメ (*Aulopus japonicus Günther*)、ヒラソウダ (*Auxis thazard thazard*)、ハナメゴチ (*Ratabulus diversidens*) の 3 種の浅海魚を用いる。

(2) 魚類の腸内細菌叢のメタゲノム解析

メタゲノム解析を用い、深海魚の腸内細菌叢の構成菌種を特定する。また、先行研究で解析されている浅海魚の腸内細菌叢と比較することで、深海魚の腸内細菌叢の特異性について調べる。

ア 手順

(ア) サンプル採取

魚を氷水漬けの状態、戸田港から学校へ輸送する。

魚の体表を70%エタノールで殺菌する。

無菌条件下で検体を開腹し腸管から腸内容物を取り出し、マイクロチューブに入れる。使用するバット・解剖はさみ・ピンセットなどの器具をオートクレーブで滅菌する。別の検体を扱う際には70%エタノールで器具を殺菌・洗浄する。

発泡スチロール箱にマイクロチューブとドライアイスと同梱して、静岡大学へ冷凍便(約-20℃)で輸送する。以降の作業は静岡大学に委託する。

(イ) DNA 抽出

サンプルのDNA抽出にはDNeasy PowerSoil Kit(QIAGEN)を使用する。

1.5ml チューブにサンプルを150~200 μ l量りとり。ビーズチューブ中の生理食塩水を、サンプルを入れたチューブに入れて攪拌する。その後、全量をビーズチューブに戻し、空になった1.5ml チューブに試薬を60 μ l入れ、残った溶液・サンプルをビーズチューブへ入れる。遠心分離と温度調節を繰り返す。

(ウ) PCR 法による DNA 増幅

生物技研の16Sプライマーにより、細菌が持つ16SrRNAのV3-V4領域をPCR法で増幅する。

(エ) 電気泳動

電気泳動を行うことで、抽出したDNAの16SrRNAが増幅されたかを確認する。

(オ) DNA サンプルのクオリティチェックを行う。

(カ) シーケンシングを業者に委託する。

(キ) シーケンスデータの分析を行う。

イ 検体魚種

検体には戸田港で水揚げされたユメカサゴ(*Helicolenus hilgendorfi*)、アオメエソ(*Chlorophthalmus albatrossis*)、ニギス(*Labracinus cyclophthalma*)の3種の深海魚を用いる。

4 結果

培養において、油脂分解菌分離用寒天培地から10株の油脂分解菌候補株が分離された。そのうち*H. hilgendorfi*と*R. Diversidents*から分離された2株が油脂分解活性試験で明確に陽性であった。非選択培地では、浅海魚はPYGB培地の方が1/20PYGBより多くのコロニーが観察され、深海魚は1/20PYGB培地の方がPYGB培地より多くのコロニーが観察された。また、検体種や温度によってはコロニーが確認されないことがあった。

メタゲノム解析では、主座標分析の結果から種ごとに菌叢の傾向が存在することが分かった。(図1) 全体の傾向として深海魚は先行研究にある浅海魚であるタイセイヨウザケに比べて、構成する菌種が少なく、多様性に乏しかった。

しかし、アオメエソの1個体が特異な傾向を示した。そのため、属レベルでの菌叢比較をし、詳しく分析すると他の種・個体に比べて多くの属で構成されていた。また、分析に用いたデータを詳しく分析すると細菌の16SrRNA領域でない配列を多く含むことが分かった。その配列をBlast検索したところ、アピコンプレクサという細胞寄生生物が持つ細胞小器官のアピコプラストの配列だと分かった。相同率は88.83%以下であった。(相同率97%以下は別種とされる事が多い。)

さらに、各サンプル中の優占種などの代表配列を調べた結果、配列の相同率が97%以下の*Enterovibrio*属の細菌が検出された。

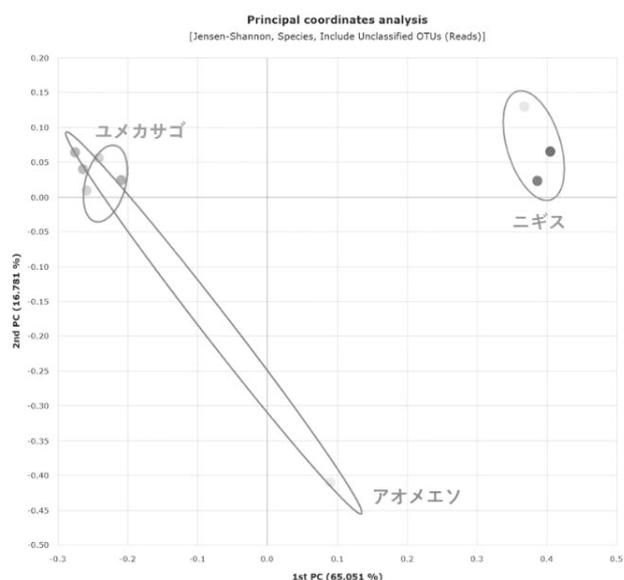


図1 主座標分析による多様性の比較

5 考察

培養実験の結果より、魚類の腸内に油脂分解菌が存在すると考えられる。油脂分解活性試験で陽性だった株の分離源がいずれも魚食性を持つ種であったことから、魚類の腸内に生息する油脂分解菌の栄養源は被食魚の脂肪であると予想される。また、深海魚の腸内にも高温、好気環境下で培養できる菌が存在した。しかし、コロニーの色や形が似たものが多かったため、そのような条件下で培養可能な菌種は少ないと思われる。また、非選択培地での培養結果から、浅海魚由来の細菌は栄養要求性が高く、深海魚由来の細菌は栄養要求性が低いことが分かった。

深海魚の腸内容物は、有用菌である油脂分解菌が存在するため、有用菌の分離源としての価値があると考えられる。また、有用菌の分離の際には栄養源の量を抑えることも有効かもしれない。

メタゲノム解析の結果より、深海魚の腸内細菌叢は多様性に乏しいと考えられる。深海という極限環境に生息するため、腸内で優占できる種が少なかったと考えられる。また、代表配列の相同性検索の結果から、既知の種と相同率が98%以下であり、別種の可能性もある配列も多かった。別種と考えられる97%以下の相同率の配列も検出された。したがって、多くの未知の種が深海魚の腸内に存在している可能性が高い。

本研究ではメタゲノム解析のサンプル数が少なく、深海魚の腸内細菌叢についてははっきりした傾向を述べることはできなかった。サンプル数を増やし、よりはっきりした傾向を分析したい。

6 参考

- (1) 古崎康哲, 石川宗孝, 中西弘, 膜分離を用いた油脂分解微生物の培養と油脂分解特性に関する基礎的研究, 環境工学研究論文集, 第34巻, 221-229, 1997.
- (2) 古崎康哲, 石川宗孝, 中西弘, 膜分離を用いた油脂分解微生物の培養と油脂分解特性に関する基礎的研究(II)～油脂分解菌の探索を中心として～, 環境工学研究論文集, 第35巻, 351-357, 1998.