

学 位 論 文 題 名

Ecological studies on the bacterial community
in the gut of abalone

（アワビ消化管内細菌群に関する生態学的研究）

学位論文内容の要旨

海産無脊椎動物の中には、海藻を摂餌する食藻性動物が多数存在する。これらの動物は難分解性の海藻多糖成分を効率的に利用していると考えられるため、反芻動物やシロアリの消化管に見られる植物多糖分解性共生微生物と同様の役割を担う微生物群が共生している可能性がある。褐藻摂餌性であるエゾアワビの消化管から分離された細菌のほとんどはアルギン酸分解性を有する非運動性の通性嫌気性細菌である新種の *Vibrio* 属細菌、*Vibrio halioticoli* で占められていることが知られており、宿主が摂餌した餌料中のアルギン酸の分解に大きな役割を担っていると推察されている。そこで本研究では、*V. halioticoli* をはじめ、エゾアワビ消化管内微生物を構成する細菌群の種類、およびそれらの役割を明らかにするための生態学的研究を行った。

まず始めに、迅速な *V. halioticoli* の特異的同定法を開発した。第1節では、16S rDNA PCR/RFLP 法を検討した。*V. halioticoli* および既知の *Vibrio* 属細菌の 16S rDNA 塩基配列を比較し、*V. halioticoli* 特異フラグメントの生成が予想された2種の制限酵素 *Eco57I* および *AccI* を用いることで *V. halioticoli* の種特異的検出が可能となった。第2節では、平

板上のコロニーから直接 *V. halioticoli* を特異検出することが可能な、コロニーハイブリダイゼーション法を検討した。耐熱性アルカリフォスファターゼで標識した *V. halioticoli* 染色体 DNA をプローブとし、反応温度 60°C、反応時間 4 時間で *V. halioticoli* の特異的検出が可能となった。

第 3 章では、種々の成長段階の個体について培養法を用いて細菌叢を調べるとともに、アルギン酸分解性細菌数、海藻多糖利用性細菌数の変動を調べた。アルギン酸、ラミナリン、マンニトールの 3 種の海藻多糖利用性細菌群は、珪藻摂餌性の稚アワビ個体では 10~100 cells/g であったが、孵化 120 日後以降その数が増加し、10⁶ cells/g となった。さらに、前章で開発した *V. halioticoli* 特異同定法を合わせて本菌の菌叢を解析したところ、稚アワビ個体では飼育海水の菌叢と極めて類似し、好気性菌群により形成されているのに対し、孵化後 4 ヶ月の人工配合飼料を投餌され始めた個体では *V. halioticoli* が主要菌種となり、孵化 1 年以後では *V. halioticoli* が消化管内細菌群の約 60% を占めることが分かった。この結果は *V. halioticoli* がエゾアワビの生活環と密接に関わる可能性を示唆するものであった。

第 4 章では、培養法では明らかにできない細菌群の構成を明らかにした。16S rDNA クローンライブラリー法による解析を行った。消化管内容物から全核酸を効率よく抽出し消化管内細菌群の 16S rDNA 全長のクローンライブラリーを作製し、その前半約 450 bp の塩基配列を決定し、各クローンの系統を近隣接合法により解析したところ、摂餌個体

では Alpha-, Gamma-, Epsilonproteobacteria および *Mycoplasma* が確認された。一方、絶食個体では *Mycoplasma*、*Propionigenium*、Alphaproteobacteria および Gammaproteobacteria が確認された。*V. halioticoli* は、絶食個体でのみ確認された。次に、このクローンライブラリー法で確認された細菌群の構成を各細菌群の特異的プローブを用いた FISH により定量的に検討した。その結果、総菌数に対する各細菌群の割合は Alphaproteobacteria が 2%、Gammaproteobacteria が 54%であった。さらに *Vibrio* 属が総菌数の 40%を占め、アワビ消化管内で優先となっていることが明らかにされた。

第 5 章では、第 2 章で開発した *V. halioticoli* 特異検出法を用いて、本菌の環境中およびエゾアワビ養殖施設内における分布を定量的に調べた。その結果、飼育原海水より珪藻の培養槽で *V. halioticoli* 生菌数が高く、珪藻試料の懸濁物付着画分の本菌数はその非付着画分より約 5 倍高かった。従って、本菌は珪藻などの懸濁物中に付着してアワビ消化管内へ取り込まれるものと考えられた。また、水槽内糞試料中の *V. halioticoli* 生菌数は、配合飼料を摂餌した個体の糞試料の方が珪藻を摂餌した個体のものより約 100 倍高いことが明らかとなった。従って、本菌は人工配合飼料を摂餌し始めた個体の消化管で活発に増殖し始めることが示唆された。以上より、*V. halioticoli* は宿主となるエゾアワビの消化管内に珪藻の摂餌とともに取り込まれ、海藻摂餌性に変化する時期に増殖した後、優占種に至るものと推察された。

第 6 章では *V. halioticoli* の宿主域を調べた。日本各地で採取した食藻性を示す無脊椎

動物およびそれらに分類上近縁とされる生物種の消化管内から細菌を分離し、*V. halioticoli* の特異検出を行った。その結果、供試したほとんどのアワビ類、およびサザエから *V. halioticoli* が検出された。日本沿岸に生息する主要なアワビの消化管内から *V. halioticoli* が検出されたことは、*V. halioticoli* が日本の沿岸域に広く分布する菌種であるとともに、アワビ類を中心とした動物の消化管内に優占種として定着している細菌と考えられた。

第7章では、アワビ消化管内における *V. halioticoli* を中心とした *Vibrio* 属細菌の役割を検討するために *in situ* 培養系における *Vibrio* 属細菌の細菌数と発酵代謝産物の変化を検討した。アルギン酸を添加した標準培地では消化管内容物接種2日後に pH の低下およびギ酸、酢酸の産生が確認され、*V. halioticoli* 菌数が 10^{4-5} CFU/ml に達した。一方、*Vibrio* 属特異的抗生物質である O/129 添加培地を用いた培養系では培養期間中 pH は変化せず、*V. halioticoli* 菌数は検出限界以下であった。これらの結果より *in situ* 培養系で検出されたギ酸、酢酸は、*Vibrio* 属細菌により産生されたことが示唆された。

以上の研究から、エゾアワビ消化管内微生物を構成する細菌群は *Vibrio* 属がその多くを占め、これらの細菌群は宿主の生活環と密接に関わりながら、消化管において植物性多糖の分解、発酵に寄与していることが示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 島 研 一
副 査 教 授 吉 水 守
副 査 助 教 授 西 澤 豊 彦
副 査 助 教 授 澤 辺 智 雄

学 位 論 文 題 名

Ecological studies on the bacterial community in the gut of abalone

(アワビ消化管内細菌群に関する生態学的研究)

褐藻摂餌性であるエゾアワビの消化管から分離された細菌のほとんどは、海藻構成多糖の分解性を有する非運動性の通性嫌気性細菌である新種の *Vibrio* 属細菌、*Vibrio halioticoli* で占められていることから、宿主が摂餌した餌料中のアルギン酸の分解に大きな役割を担っていると推察されている。本研究は、*V. halioticoli* をはじめ、エゾアワビ消化管内微生物を構成する細菌群の種類、およびそれらの役割を明らかにするための生態学的研究を行ったものである。特に評価される成果は以下のとおりである。

1. *V. halioticoli* の迅速な特異的同定法を2種類開発した。1つは、16S rDNA PCR/RFLP法であり、*V. halioticoli* および既知の *Vibrio* 属細菌の16S rDNA塩基配列を比較し、*V. halioticoli* 特異フラグメントの生成が予想された2種の制限酵素 *Eco57I* および *AccI* を用いることで *V. halioticoli* の種特異的検出を可能とした。2つ目は、平板上に増殖したコロニーの中から *V. halioticoli* のみを特異同定することが可能なコロニーハイブリダイゼーション法であり、耐熱性アルカリフォスファターゼで標識した *V. halioticoli* の染色体DNAをプローブとし、反応温度60℃で4時間交雑反応を行うことで *V. halioticoli* の特異同定を可能とした。
2. *V. halioticoli* 特異同定法を利用してエゾアワビ消化管内細菌叢の形成過程を明らかにした。稚アワビ個体では飼育海水の菌叢と極めて類似し、好気性菌群により形成さ

れているのに対し、孵化後4ヶ月経過し人工配合飼料を投餌され始めた個体では *V. halioticoli* が主要菌種となり、孵化1年以後経過すると *V. halioticoli* が消化管内細菌群の約60%を占めることを明らかにした。この結果は、*V. halioticoli* がエゾアワビの生活環と密接に関わる可能性を示唆するものであった。

3. 培養法では明らかにできないエゾアワビ消化管内細菌群の構成を16S rDNA クローンライブラリー法および蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション(FISH)法により明らかにした。まず、クローンライブラリー法により得られた各クローンの系統を近隣接合法により解析したところ、摂餌個体では Alpha-, Gamma-, Epsilonproteobacteria および *Mycoplasma* の存在を示した。一方、絶食個体では *Mycoplasma*、*Propionigenium*、Alphaproteobacteria および Gammaproteobacteria の存在を示した。絶食個体のクローンからは *V. halioticoli* も確認された。次に、クローンライブラリー法で確認された細菌群の構成を各細菌群特異的プローブを用いた FISH により定量的に検討したところ、Gammaproteobacteria が54%を占め、中でも *Vibrio* 属が総菌数の40%を占め、アワビ消化管内で優占となっていることを明らかにした。
4. *V. halioticoli* 特異検出法を用いて、本菌の環境中およびエゾアワビ養殖施設内における分布と宿主域を調べた。その結果、*V. halioticoli* は宿主となるエゾアワビの消化管内に珪藻の摂餌とともに取り込まれ、海藻摂餌性に変化する時期に増殖した後、優占種に至ると推察した。また、日本沿岸に生息する主要なアワビの消化管内から *V. halioticoli* を検出し、*V. halioticoli* が日本の沿岸域に広く分布する菌種であるとともに、アワビ類を中心とした動物の消化管内に優占種として定着している細菌であることを示唆した。
5. アルギン酸塩およびアワビ配合飼料を添加した培地を用いた *in situ* 培養系における *Vibrio* 属細菌の細菌数と発酵代謝産物の変化を調べ、アワビ消化管内における *V. halioticoli* を中心とした *Vibrio* 属細菌の役割を検討した。この *in situ* 培養系では、*V. halioticoli* 菌数の増加に伴いギ酸、酢酸および乳酸の産生が観察されるが、抗 *Vibrio* 物質の添加によりギ酸および酢酸の産生が抑制されることを示した。このことは、*Vibrio* 属細菌がギ酸および酢酸の産生の主体であることを示す。

以上の成果は、エゾアワビ消化管内細菌群の多くは *Vibrio* 属であり、これらの細菌群は宿主の生活環と密接に関わりながら、宿主の摂餌した海藻多糖の分解および発酵代謝

に寄与していることを示すものである。これらの知見は、アワビをはじめ各種海藻摂餌性海産無脊椎動物の増養殖への応用が期待されることから、博士（水産科学）の学位を授与される資格のあるものと判定した。