

ヒイラギ腸管内の硫酸還元細菌について

誌名	水産増殖 = The aquiculture
ISSN	03714217
著者	陳, 家輝 相良, 和之 糸井, 史朗 杉田, 治男
巻/号	60巻4号
掲載ページ	p. 519-521
発行年月	2012年12月

ヒイラギ腸管内の硫酸還元細菌について

陳 家輝・相良和之・糸井史朗・杉田治男*

Sulfate-reducing Bacteria in the Intestinal Tract of Spotnape Ponyfish *Leiognathus nuchalis*

Chia-Hui CHEN, Kazuyuki SAGARA, Shiro ITOI
and Haruo SUGITA*

Abstract: The diversity and density of sulfate-reducing bacteria (SRB) in the intestinal tract of spotnape ponyfish *Leiognathus nuchalis* were determined by the clone library analysis and real-time PCR technology targeting *dsrA*, respectively. As a result, SRB was detected in one of five specimens of spotnape ponyfish with a density of 3.3×10^8 copies/g. Thirty-two clones in the library were composed of four families of SRB including *Desulfobacteraceae* (6 species, 13 clones), *Desulfobulbaceae* (3 species, 13 clones), *Desulfomicrobiaceae* (1 species, 3 clones) and *Desulfovibrionaceae* (2 species, 3 clones). These results suggested that the intestinal tract of spotnape ponyfish was populated by diverse species of SRB.

Key words: *Leiognathus nuchalis*; Sulfate-reducing bacteria; Intestinal bacteria; *dsrA*

魚類の腸内細菌叢は、これまでは主に培養法によって解明されてきており、淡水魚類では一般に *Aeromonas* 属細菌のような通性嫌気性細菌が優占するほか、ティラピア *Oreochromis niloticus*、コイ *Cyprinus carpio*、キンギョ *Carassius auratus*、アユ *Plecoglossus altivelis* などでは *Cetobacterium somerae* などの偏性嫌気性細菌も優占することが報告されている (杉田 2008)。これに対して、海水魚類では *Vibrio* 属細菌などの通性嫌気性細菌が優占するものの、偏性嫌気性細菌は検出されないか、存在しても少ないことが知られている (杉田 2008)。一方、硫酸還元細菌 (Sulfate-reducing bacteria; SRB) は、沿岸水域や汽水水域の底泥などに普遍的に生息する偏性嫌気性細菌であるため (Kondo 2008; 近藤 2011)、このような水域に生息する魚類

の腸管内には SRB が存在することが予想されるが、これまでに SRB を対象とした研究例はない。SRB は電子受容体として硫酸イオン (SO_4^{2-}) を、電子供与体として水素 (H_2) や有機酸を利用することが知られている (近藤 2011)。一般に海水魚類は浸透圧調節のため、1日に体重の10%以上の海水を飲むが、硫酸イオンなどの2価イオンは塩類細胞に吸収されずに腸に達し、糞便とともに排泄されることから (Wedemeyer 1996)、腸内環境では硫酸イオンが豊富に存在すると考えられる。また、腸管内では腸内細菌によって有機酸が生産されることから、SRB の生息場所として海水魚類の腸管内は適していると推定される。さらに、ヒトの大腸などでも SRB が高密度で生息することが報告されている (Christophersen et al. 2011)。しかし、SRB が生産する硫化水素 (H_2S) は魚類にとって有害であることから (Wedemeyer 1996)、腸管内での SRB の増殖が魚類の成長などに影響を及ぼす可能性が考えられる。そこで本研究では海水魚類腸管内における SRB の実態を把握するための第一歩として、砂泥底の内湾などで底生動物を捕食するため SRB との接触機会が多いと考えられるヒイラギ *Leiognathus nuchalis* を研究材料に用いて、リアルタイム PCR 法による SRB の定量とクローンライブラリー法による SRB 群集の解析を試みた。

本研究では、2011年10月に藤沢市片瀬漁港で採取したヒイラギを使用した。使用した5個体は、いずれも外見上疾病などの異常のないものであり、体重は19.4~32.1 gであった。供試魚は氷冷して研究室に持ち帰り、採取後5時間以内に以下の処理を行った。

まず、試料を解剖して腸管を摘出した後、内容物を滅菌したマイクロチューブに収容し、 -80°C で保存した。また試料の一部は 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) で染色し、落射蛍光顕微鏡 (BX50, オリンパス) で全菌数を測定した (Porter and Feig 1980)。

腸管内容物 (0.1 g) は FastPrep FP120 (BIO101) を用いて40秒間 (速度6.0) ビーズで破碎した後、FastDNA spin kit for soil (MP Biomedicals) を用いて DNA を抽出し、さらにスピнкаラム Quantum Prep PCR Kleen Spin (Bio-Rad) を用いて残存する PCR 阻害物質を取り除いた。

抽出した DNA を鋳型として、DSR-1F+ (5'-ACSCACTGG AAGCACGGCGG-3'; Kondo et al. 2008) および dsr969R (5'-CATRTCGTCKYKCCAGGT-3'; Pérez-Jiménez and Kerkhof 2005) のプライマーセットを用いた PCR (polymerase chain reaction) 法によって、亜硫酸還元酵素の α サブユニットをコードする遺伝子 (*dsrA*) の DNA 断片を増幅した。鋳型 DNA 1.0 μl 、5×緩衝液 (Promega) 4.0 μl 、2 mm MgCl_2 (終濃度)、200 μM deoxyribonucleoside triphosphate (終濃度)、0.4 μM プライマー (終濃度) および 1 U GoTaq (Promega)

2012年8月2日受付; 2012年9月20日受理.

日本大学生物資源科学部海洋生物資源科学科 (Department of Marine Science and Resources, Nihon University, Kameino, Fujisawa, Kanagawa 252-0880, Japan).

*連絡先 (Corresponding author): Tel & Fax, (+81) 466-84-3680; E-mail, sugita@brs.nihon-u.ac.jp (H. Sugita).

を軽く混合し、滅菌超純水で全量を20 μ lに調整した。PCR反応は以下の条件で行った：95°Cで60秒間の熱変性した後、95°Cで10秒間の熱変性、55°Cで20秒間のアニーリング、72°Cで45秒間の伸長を1サイクルとし、これを30サイクル繰り返し、最後に72°Cで60秒間の伸長反応を行った。

増幅した *dsrA* の DNA 断片を pGEM-T Easy Vector System (Promega) を用いてベクターに連結し、*Escherichia coli* DH5 α に形質導入してクローンライブラリーを構築した。M13のプライマーセット (Invitrogen) を用いた PCR 法で各クローンに形質導入した *dsrA* を増幅した。PCR 産物をポリエチレングリコール法 (Hiraishi 1992) で精製した後、前述の DSR-1F+または *dsr969R* をプライマーに用いて BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) でラベリングし、3130xl 型 DNA オートシークエンサー (Applied Biosystems) で *dsrA* の部分塩基配列を解読した。部分塩基配列は DNA Data Base of Japan (DDBJ; <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) の提供するプログラム BLAST を用いて同源性検索を行った。

ヒイラギ腸管内容物中の SRB は *dsrA* を標的とするリアルタイム PCR 法によって定量した。QuantiFast SYBR Green PCR kit (QIAGEN) 10 μ l, *dsr192F*プライマー (5 μ M; 5'-CA CGGWTCACCCGGWGAYATCAT-3') 1.6 μ l, 前述の *dsr969R* プライマー (5 μ M) 1.6 μ l および鋳型 DNA 1.0 μ l を軽く混合し、滅菌超純水で全量を20 μ lに調整した。また *Desulfotalea psychrophila* (CR522870) の *dsrA* を PCR 増幅し、精製して標準 DNA を調製した。各反応液を加えたマイクロチューブを ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) に装着し、95°Cで12分間の熱変性を行った後、95°Cで10秒間の熱変性、55°Cで20秒間のアニーリング、72°Cで30秒間の伸長反応を1サイクルとし、それを45サイクル繰り返した。PCR 反応が終了した後、増幅曲線を確認し、閾値線の位置から求めた Ct 値と標準 DNA 濃度から検量線を作成した。さらに、各試料の Ct 値から検量線を用いて SRB の密度 (copies/g) を推定した。

DAPI 染色によって求めた全菌数は $3.9 \times 10^{10} \sim 6.5 \times 10^{10}$ cells/g であり、この値は沿岸魚類の全菌数 (Sugita et al. 2005; 田中ら 2012) とほぼ同等のレベルであった。また、ヒイラギ全5個体のうち、PCR 増幅およびリアルタイム PCR 法で SRB が検出されたのは1個体のみであり、密度

は 3.3×10^8 copies/g と推定された。SRB 1細胞当たり 1 copy の *dsrA* を保有すると仮定すると、この数値は全菌数の約 0.53%に相当した。田中ら (2012) は、下田市沿岸で採取した海水魚類 6 魚種の腸管内容物から各々約50クローンから成る 16S rDNA-クローンライブラリーを構築したが、SRB はいずれの試料からも検出されなかった。これらの試料に本研究のヒイラギと同程度に SRB が存在すると仮定すると、16S rDNA を標的として SRB を検出するには、1ライブラリー当たり200以上のクローンを構築する必要があると考えられる。

次に、*dsrA* が検出されたヒイラギの腸管内容物から構築した *dsrA* クローンライブラリーの組成を Table 1 に示した。全32クローンの近縁種の内、26クローンは *Desulfobacteraceae* 科 (6属6種13クローン) および *Desulfobulbaceae* 科 (3属3種13クローン) から成る *Desulfobacterales* 目に、6クローンは *Desulfomicrobiaceae* 科 (1属1種3クローン) および *Desulfovibrionaceae* 科 (1属2種3クローン) から成る *Desulfovibrionales* 目に分類された。これらの細菌種の内、*Desulfofustis glycolicus* (AF418191), *Desulfosarcina variabilis* (AF360643) および *Desulfotalea psychrophila* (CR522870) が5~6クローンで多数を占めた。以上の結果からヒイラギ腸管内の SRB は少なくとも12種から構成され、比較的多様性の高い群集であることが判明した。また、各クローンの *dsrA* および各種の標準株の16S rRNA 遺伝子の分子系統樹を比較したところ、各クラスターを構成する菌種は類似していることが判明し (データ未記載)、従来の報告 (Wagner et al. 1998) とほぼ一致した。

本研究では、ヒイラギ5個体内の、SRB が検出されたのは1個体のみであった。この事実は、ヒイラギの一部にのみ SRB が生息していることのほかに、他の4個体における SRB 密度が検出限界 (1.3×10^6 cells/g) 以下であった可能性も否定できない。また、ヒイラギは多毛類や甲殻類など小型の底生動物を捕食することから、捕食した餌生物に SRB が高密度で存在し、その影響で散発的に SRB が検出された可能性も考えられる。さらに、クローンライブラリー法では、標的とする DNA 塩基配列が存在すれば、死菌であっても検出されることから、今後はこれらについても検討する必要がある。前述したように、SRB の生産する硫化水素は宿主魚類にとって有害であることから、SRB が高密度で

Table 1. Composition of the closest taxonomic relatives in the clone library constructed from the intestinal tract of spotnape ponyfish

Order	Family	Closest relative (accession no.)	Identity (%)	Length (bp)	No. of clones	Accession no.
<i>Desulfobacterales</i>	<i>Desulfobacteraceae</i>	<i>Desulfobacter postgatei</i> (AF418198)	82.7-82.9	443-506	2	AB745747
		<i>Desulfobacterium vacuolatum</i> (AF418203)	84.6	507	1	AB745756
		<i>Desulfocella halophila</i> (AF388211)	81.8	507-508	2	AB745755
		<i>Desulfosalsimonas propionica</i> (DQ386237)	81.6	507	1	AB745754
		<i>Desulfosarcina variabilis</i> (AF360643)	84.2-90.6	434-522	5	AB745757
		<i>Desulfospira joergensenii</i> (AF551759)	83.1-84.0	507	2	AB745750
	<i>Desulfobulbaceae</i>	<i>Desulfobulbus propionicus</i> (CP002364)	81.7-82.6	507	2	AB745752
		<i>Desulfofustis glycolicus</i> (AF418191)	81.1-82.3	448-516	6	AB745748
		<i>Desulfotalea psychrophila</i> (CR522870)	81.3-83.0	450-507	5	AB745751
<i>Desulfovibrionales</i>	<i>Desulfomicrobiaceae</i>	<i>Desulfomicrobium escambiense</i> (AB061531)	92.7-93.1	507-522	3	AB745746
		<i>Desulfovibrionaceae</i>	<i>Desulfovibrio halophilus</i> (AF482461)	78.8-81.6	507	2
	<i>Desulfovibrio portus</i> (AB373125)		90.4	507	1	AB745753

存在した場合には水産養殖を行ううえで何らかの悪影響が
できる可能性も考えられることから、今後、多くの養殖対象
魚についても研究を遂行する必要がある。

謝 辞

本研究は、(独)日本学術振興会科学研究費補助金の助成
を受けて実施されたものである。

文 献

- Christophersen, C. T., M. Morrison and M. A. Conlon (2011) Overestimation of the abundance of sulfate-reducing bacteria in human feces by quantitative PCR targeting the *Desulfovibrio* 16S rRNA gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 3544-3546.
- Hiraishi, A. (1992) Direct automated sequencing of 16S rDNA amplified by polymerase chain reaction from bacterial cultures without DNA purification. *Lett. Appl. Microbiol.*, **15**, 210-213.
- 近藤竜二 (2011) 硫黄循環と細菌の代謝. 増補改訂版・海の環境微生物学 (石田祐三郎・杉田治男編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 95-100.
- Kondo, R., K. Shigematsu and J. Butani (2008) Rapid enumeration of sulphate-reducing bacteria from aquatic environments using real-time PCR. *Plankton Benthos Res.*, **3**, 180-183.
- Pérez-Jiménez, J. R. and L. J. Kerkhof (2005) Phylogeography of sulfate reducing bacteria among disturbed sediments, disclosed by analysis of the dissimilatory sulfite reductase genes (*dsrAB*). *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 1004-1011.
- Porter, K. G. and Y. S. Feig (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.*, **25**, 943-948.
- 杉田治男 (2008) 腸内細菌とプロバイオティクス. 養殖の餌と水-陰の主役たち (杉田治男編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 166-180.
- Sugita, H., M. Kurosaki, T. Okamura, S. Yamamoto and C. Tsuchiya (2005) The culturability of intestinal bacteria of Japanese coastal fish. *Fish. Sci.*, **71**, 956-958.
- 田中祐輔・陳家輝・小崎照邦・込宮雄介・糸井史朗・杉田治男 (2012) クローンライブラリー法による沿岸魚類腸内細菌群集の解析. 水産増殖, **60**, 333-340.
- Wagner, M., A. J. Roger, J. L. Flax, G. A. Brusseau and D. A. Stahl (1998) Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration. *J. Bacteriol.*, **180**, 2975-2982.
- Wedemeyer, G. A. (1996) *Physiology of Fish in Intensive Culture System*, Chapman and Hall, New York, pp. 24-80.