

マガキ殻表面吸着細菌の生態に関する基礎研究

呉工業高等専門学校 学生会員 ○徳永 航太
呉工業高等専門学校 非会員 胡子 颯太
呉工業高等専門学校 非会員 岩崎 祐樹
呉工業高等専門学校 非会員 木村 善一郎

1.はじめに

広島県は国内有数の養殖カキ産地である。同県で生産されるマガキの大部分は剥きガキとして出荷されるが、カキ殻を剥く専門職(打ち子)の高齢化が問題となっており、近い将来においてカキの出荷形態は剥きガキから殻付きガキに転換せざるを得ない状況が生じると予想されている。ここで問題となるのは出荷する際のカキ殻について微生物学的安全・衛生基準が存在しないということである。カキ殻に付着する微生物についての文献は存在しないが、その安全・衛生基準の確立は同県のカキ養殖業における打ち子の絶滅という産業構造の変化を受け、非常に重大な課題となる。従って筆者らはこの課題解決のため、呉市のカキ養殖企業との協働によりカキ殻表面に存在する全バクテリア由来 DNA の定量検出に取り組んでいる。その結果としてカキ殻 1g には 1 億匹を超えるバクテリアが付着していることを解明した。

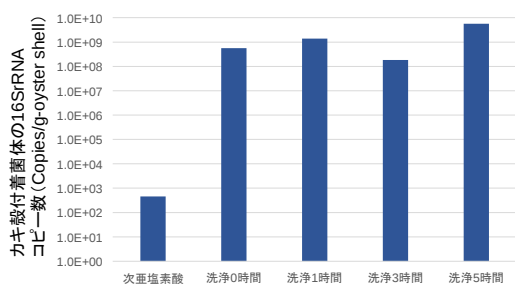


図-1 カキ殻表面の菌数

またカキ殻に存在する微生物の菌叢を調査し、例外なく *Microvirgula aerodenitrificans* という種が高い占有比率で存在していることを世界で初めて明らかとした。本研究では過去に報告されたいくつかの文献知を総合することで、同細菌がマガキに及ぼす影響について2つの仮説を考案した。

仮説 1, 同細菌の作用によりカキ殻がアラゴナイト相からカルサイト相に移行している

貝類の殻の主成分は炭酸カルシウムであるが、カキ類を除くほとんどの貝類はアラゴナイト(炭酸カルシウム結晶の一種)で構成されるのに対し、カキ類成体に限っては同質異像結晶であるカルサイトで構成されている。カキ類は稚貝の時点ではアラゴナイ

ト相の殻を持つが、成長に伴いカルサイト相に移行することが知られている¹⁾。またこれとは別にアコヤガイ(真珠貝の一種)が同菌種を含む細菌群に感染することで、通常アラゴナイトで構成される真珠がカルサイトで構成さ

れた異常真珠化するという知見も報告されている²⁾。これら2つの知見を総合すると、カキ殻への *Microvirgula* の付着によりアラゴナイト殻からカルサイト殻への異像化が起こるという仮説が導かれる。

仮説 2, 同細菌はノロウイルスの特異的吸着作用を持つ

M. aerodenitrificans は従来廃水処理生態系(e.g.活性汚泥)から検出の報告が多い微生物である。活性汚泥内の微生物にはヒト腸管に感染し増殖したノロウイルスを吸着するキャリアーとなる種が存在する³⁾。ノロウイルスはこれらのキャリアー微生物に吸着することで塩素消毒による不活化を免れ海域に流入し、カキ等の貝類に蓄積されて再度ヒトに感染する。本研究では廃水処理生態系とカキ殻表面という全く異なる環境から *M. aerodenitrificans* が共通して検出されたという新知見に基づき、本菌種にノロウイルスの吸着能があり、廃水とカキを結ぶキャリアーであるという仮説を立案した。

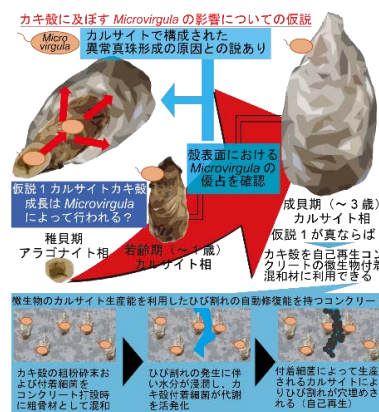


図-2 仮説 1 概要

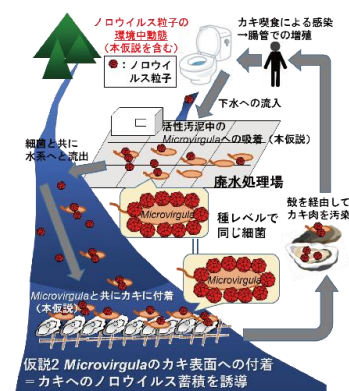


図-3 仮説 2 概要

上記2仮説の証明に最も効果的なのはカキ殻表面の *M. aerodenitrificans* を分離し、その性質を調査することである。従って本研究では当該細菌の分離培養に

キーワード *Microvirgula aerodenitrificans*, アラゴナイト, カルサイト, 活性汚泥, 環境メタゲノム

連絡先 〒737-8506・呉市阿賀南 2-2-11

呉工業高等専門学校プロジェクトデザイン工学専攻 Mail: S22-khxc@kure,kosen-ac.jp

取り組んだ。

2,実験内容

上記仮説実験で使用するマガキは,令和元年度の本校インキュベーションワークで譲り受けたものを使用した。

2,1 牡蠣殻表面に付着した微生物の獲得

寒天平板培地法を用いて,マガキ殻表面に付着している微生物の集積,そこから画線培養法で菌を純粋化した.培地の組成は表-1 に示した。

表-1 集積・分離培養用の培地の組成

	分量
R2A Broth ダイゴ	3,2g/L
KH2PO4	3,2g/L
K2HPO4	9,7g/L
KNO3	0,5mmol/L

2,2 Cell Lysate の作成

画線培養によって獲得できたコロニーは,DW を入れたチューブに懸濁し,BL buffer と Proteinase K 溶液を用いて,純粋化したコロニーから Cell Lysate の作成を行った.プロトコルは下記に記載。

- ①チューブにコロニーと試薬を混和。
- ②60℃ー20 分,95℃ー5 分で溶菌。
- ③10000rpm,15 分で遠心分離を行い上清を回収した。

2,3 PCR 反応

作成した Cell Lysate に Sapphire Amp とプライマーを混和し,サーマルサイクラーを用いて,PCR 反応を行った.プロトコルは下記に掲載。

- 予熱 95℃ー2 分
- PCR サイクル (35 サイクル)
 - 熱変性 95℃ー10 秒
 - アニーリング 55℃ー5 秒
 - 伸長 72℃ー30 秒
- 最終伸長 72℃ー2 分

2,4 PCR 産物の精製と解析

PCR 産物は,電気泳動による増幅が確認されたのち,AMPure XP を用いて,精製を行い,シーケンスプライマーを混和し,サンガーシーケンス解析サービス (FASMAC 株式会社) に解析を外注し,得られた塩基配列を NCBI データベースと照合し,種の同定を行った。

3,実験結果と考察

3,1 サンプルの解析結果

解析には全部で 40 サンプルを外注したが,そのうち,塩基配列を解析できたのは下記の表-2 に示す 16 サンプルとなった。

3,2, *M,aerodenitrificans* の分離

3,1 から本研究の目的である *M,aerodenitrificans* の分離株を獲得することには至らなかった.その代わりに,カキの食中毒の原因の一つであるビブリオ菌の分離には成功した。

表-2 実際に解析できたサンプル一覧

Family	genus	closest relative	similarity(%)
Bacillaceae	Bacillus	Bacillus eiseniae	91.13
Caulobacteriales	Brevundimonas	Brevundimonas diminuta	98.9
Comamonadaceae	Delftia	Delftia acidovorans	99.51
Comamonadaceae	Delftia	Delftia acidovorans	94.24
Comamonadaceae	Delftia	Delftia acidovorans	94.85
Comamonadaceae	Delftia	Delftia acidovorans	96.4
Enterobacteriaceae	Escherichia	Escherichia fergusonii	99.51
Enterobacteriaceae	Escherichia	Escherichia fergusonii	99.78
Enterobacteriaceae	Escherichia	Escherichia fergusonii	99.39
Enterobacteriaceae	Escherichia	Escherichia fergusonii	99.15
Bacillaceae	Exiguobacterium	Exiguobacterium aestuarii	97.06
Bacillaceae	Exiguobacterium	Exiguobacterium aestuarii	98.9
Microbacteriaceae	Microbacterium	Microbacterium paraoxydans	95.35
Microbacteriaceae	Microbacterium	Microbacterium paraoxydans	98.51
Vibrionaceae	Vibrio	Vibrio furnissii	99.63
Vibrionaceae	Vibrio	Vibrio furnissii	98.9

4,まとめと今後の課題

・この結果から,牡蠣殻表面において占有してにも関わらず,*M,aerodenitrificans* の分離に至らなかった.従って当該細菌が難培養性である可能性が示唆された.一般に海洋細菌は難培養性であることが知られており,培養可能種は全体の 0.1%程度であると見積もられている.今回の培養条件では当該細菌がコロニーを形成することが無かったと考えられた.本研究の分離条件では獲得することが困難であると考えられるため,今回の実験で使用した培地とは別の培地を用いて再度分離を行う,あるいはカキ殻から直接ゲノム DNA を抽出し環境メタゲノムから当該細菌のゲノムを再構成し,仮説 1,2 を検証する必要がある。

5,参考文献

1) Carriker et al., (1991), Chemical elements in the aragonitic and calcitic microstructural groups of shell of the oyster Crassostrea virginica: a proton probe study, *Marine Biology*, 109(2), 287-297.

2) Ogimura et al., (2012), Deformation and blemishing of pearls caused by bacteria, *Fisheries ciencia*, 78(6), 1255-1262.

3) Miuraet a., (2013), Histo-blood group antigen-like substances of human enteric bacteria as specific adsorbents for human noroviruses, *Journal of virology*, 87(17), 9441-9451.