

揮発性抗カビ物質を産生するオカダンゴムシ腸内細菌の研究

片岡 証人（筑波大学生物学類）

指導教員：豊福 雅典（筑波大学生命環境系）

【背景】

陸生の節足動物は様々な細菌と共生していることが知られており、共生細菌が宿主の発生や栄養獲得、免疫等に関与する例が報告されている。オカダンゴムシ(*Armadillidium vulgare*)は、土壌中に生息し、動植物の枯死体を食べて分解・排出することで、生態系における分解者としての役割を担っている。このような生息環境や食性から、多くの微生物と接触し、相互作用していると考えられる。私はオカダンゴムシの糞便から、真菌の生育を抑制する細菌 *Brevibacterium sediminis* H4 株を単離した。そこで本研究は、この細菌株が産生する抗真菌物質を同定し、オカダンゴムシの腸内細菌として宿主に影響を与える可能性があるか検証することを目的とした。

【方法】

揮発性物質の抗真菌試験

H4 株が産生する物質の試験では、揮発性物質のみの影響を評価するため、2分割シャーレを用いて、プラスチック隔壁で分断され上部気相のみが交換される LB および PDA 寒天培地を作製した。LB 寒天培地側に H4 株を植菌して 30℃ で 24 時間培養した後、PDA 培地側にカビ *Aspergillus niger* CBS513.88 株孢子懸濁液を滴下した。

ジメチルジスルフィド (DMDS) の試験では、ガラスシャーレ内のろ紙に DMDS を滴下し、*A. niger* を滴下した PDA 培地もしくは H4 株培養液を滴下した LB 寒天培地を入れた。

これらをビニールテープで密封し、*A. niger* は 48 時間、H4 株は 72 時間培養し、カビまたは H4 株の被覆面積を画像定量によって測定した。

H4 株が産生する揮発性物質の解析

H4 株を LB 寒天培地上で一晩培養した後、形成したコロニーを培地ごとくりぬいてバイアルに封入した。これをさらに 24 時間培養し、バイアル内の気相を採取しガスクロマトグラフィー質量分析 (GC-MS) によって解析した。

オカダンゴムシにおける H4 株の分布調査

調査に用いたオカダンゴムシは筑波実験林から採取された。糞便はオカダンゴムシを滅菌シャーレ内で数時間～1日飼育することで回収し、DNA を抽出した。腸管サンプルは、採取後1日間無菌・無餌で飼育したオカダンゴムシを解剖して採取し、DNA を抽出した。

糞便内の細菌は、16S rRNA を標的としたユニバーサルプライマーおよび *Brevibacterium* 属特異的プライマーを用いたネステッド PCR 法によって検出した。腸管内の細菌は、16S rRNA の保存領域を標的としたプライマー¹を内部標準に、可変領域を標的とした属特異的プライマー²を *Brevibacterium* 属の検出に用いて qPCR 法によって検出・定量した。

オカダンゴムシに対する H4 株の誘因性の試験

水で濡らしたろ紙を敷いたシャーレに、H4 株培養液を定着させたニンジン片とさせていないニンジン片を一つずつ配置し、そ

のシャーレ内にオカダンゴムシを1個体ずつ入れて24時間行動を撮影した。撮影された映像を解析し、各ニンジン片の周囲に滞在した累積時間を算出した。

【結果および考察】

同一シャーレ内にプラスチック壁で分断された2つの寒天培地を作製し、この細菌株と真菌を隔離培養したところ、真菌の生育抑制が抑制されたことから、揮発性の抗真菌物質を産生していることが示された。そこで本細菌株の培養容器内気相を GC-MS によって分析したところ、DMDS が検出された。DMDS は標品においても抗真菌活性が確認され、一方で H4 株自身の生育に対してはほとんど影響しなかった。これらのことから、H4 株が産生する揮発性抗真菌物質のひとつとして DMDS が同定された。

本細菌がオカダンゴムシの腸内に一般的に存在するか検証するため、*Brevibacterium* 属特異的プライマーを用いた PCR および定量 PCR を行った。その結果、調査したほとんどのオカダンゴムシ個体の糞便および後腸から同属細菌が検出された。このことから、本属の細菌はオカダンゴムシにおいて一般的に存在する腸内細菌であることが示唆された。

最後に、オカダンゴムシが利益を生じる可能性のある当細菌を積極的に取り込む行動をとるのか検証するため、H4 株を定着させた餌と定着させていない餌を置いた容器内におけるオカダンゴムシの行動トラッキング解析を行った。その結果、24時間のトラッキング中における各餌周辺の累積滞在時間に明確な差異は認められず、オカダンゴムシに対する H4 株の誘因性は確認されなかった。

【考察】

以上の結果から、DMDS 等の揮発性抗真菌物質を産生する *Brevibacterium* 属細菌が、オカダンゴムシの一般的な腸内細菌であることが示唆された。宿主に対しての生態学的な機能に関してはさらに検証する必要があるが、本研究の成果は、揮発性物質が関与する細菌・真菌・動物の新たな相互作用モデルの提案につながる可能性がある。

【文献】

1. Muyzer, G *et al.* 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:695-700.
2. Monnet, C. *et al.* 2013. Quantification of Yeast and Bacterial Gene Transcripts in Retail Cheeses by Reverse Transcription Quantitative PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**:469-477