

助成番号 0627

塩湿地の底生生物が持つセルロース同化能力に関する研究

豊原 治彦, 朴 煥華, 坂本 健太郎

京都大学農学研究科

概要 【目的】 セルロースは植物の細胞壁を構成する主要成分であり、地球上に最も多く存在する有機物であるが、難分解性であるためこれを分解できる動物はきわめて限られている。セルロース分解者としては、陸上では草食動物、シロアリ、細菌、菌類、原生生物などが、水圏では細菌、菌類及び原生生物などが知られている。しかし近年、アワビ、ムラサキイガイ及びヤマトシジミなどがセルロース分解能を有することが明らかとなってきたことから、セルロース分解能が海洋生物に広く分布している可能性が示唆されている。一方、干潟には陸起源有機物が大量に流入することから、生態的にセルロース分解の主要な場であると予想されるが、具体的な分解者は特定されていない。そこで本研究では、干潟のメイオベントスに着目し、そのセルロース分解能及び生態的機能を明らかにすることを目的とした。

【材料及び方法】 2006年5月から2006年7月にかけて北海道・風蓮湖及び琵琶瀬川河口干潟、大阪市・淀川長柄橋及び十三大橋付近の干潟、加古川市・加古川河口干潟、の5地点でサンプリングを行った。干潮時に各地点において表層3~5 cmの底泥を採集した。採集したサンプルは環境水あるいは人工海水を用いた「かきまぜ法」により目合い1 mm~40 µmの篩にかけ、篩に残った生物試料をメイオベントスサンプルとした。それらは環境水あるいは人工海水とともに未固定4°Cで保存した。セルラーゼ活性は、分子量を特定できるという長所を有するザイモグラフィ（電気泳動）法を用い、カルボキシメチルセルロースを基質として測定した。

【結果及び考察】 すべての干潟において線虫が観察されたが、その他に環形動物(多毛類・貧毛類)や節足動物なども認められた。これらの生物を単離し、個々の生物の抽出液についてセルラーゼ活性を調べた結果、淀川および風蓮湖の線形動物にセルラーゼ活性が認められたほか、一部の節足動物と環形動物にも活性が認められた。しかし、全く活性を示さないメイオベントスも多数存在した。最も強い活性は、風蓮湖の貧毛類から検出された。

一方、各干潟の底泥抽出液をザイモグラフィに供したところ、すべての干潟において複数の活性バンドが検出された。この結果は、各干潟においてセルロース分解に複数の酵素が関与していることを示唆していた。最も強い活性は、風蓮湖および琵琶瀬川の底泥抽出液に認められた。各干潟の優占種の活性バンドと底泥抽出液の活性バンドを比較した結果、風蓮湖と琵琶瀬川においては、底泥抽出液と優占種(貧毛類および節足動物)の活性バンドの位置が一致したが、淀川及び加古川においては、両者のバンドパターンは一致しなかった。このことから琵琶瀬川及び風蓮湖の干潟のセルラーゼ活性は主にメイオベントスが担っており、その他の干潟のセルラーゼ活性はメイオベントス以外の生物、おそらくさらに微小な真核生物や細菌類が担っている可能性が推測された。

一般的に水温が低い地域では細菌類の数が少ないことが知られているが、本研究において風蓮湖と琵琶瀬川の泥抽出液と優占種の活性バンドの位置が一致したことは、寒冷地の干潟ではセルロースは主に貧毛類などのメイオベントスによって分解されている可能性を示唆するものであった。

1. 研究目的

陸上から河川に流入する有機物のうち、セルロースは最も豊富な有機物である。セルロースは植物細胞壁を構成する主成分であり、地球上に最も多く存在する有機物であるが、難分解性であるためこれを分解できる動物はきわめて限られていると考えられてきた。そのため、動物の

栄養源としては注目されず、栄養塩類等の研究に比べると生態学的な研究は立ち遅れている。

セルロースを摂餌する生物としては、陸上では草食動物、シロアリ、細菌、菌類、原生生物などが、水圏では細菌、菌類及び原生生物などが知られている。このうち、草食動物やシロアリについては、近年までセルロースは共生

する細菌や原生生物によって分解されると考えられ、結局のところいわゆる高等生物はセルロースを分解する能力を持たないとされてきた。しかし最近になって、シロアリから内源性のセルロース分解酵素、すなわちセルラーゼの遺伝子が発見され、従来の概念が覆されることとなった。その後、アワビやムラサキガイ、及び塩湿地の二枚貝優先主であるヤマトシジミからも内源性セルラーゼ遺伝子が発見され、セルロース分解能が水棲生物にも広く分布している可能性が示唆されている。

一方、近年河川上流域への植林によって河口域で養殖カキの成育が良くなった例を始め、陸起源物質の沿岸域生態系に与える影響が注目を浴びている。陸域と海域の接点に位置する塩湿地は、海域からだけではなく、河川や陸上生態系からも数々の物質が絶えず供給されており、このような塩湿地に住む様々な底生生物は、陸上や河川水から供給される有機物を摂餌していると考えられている。しかし、実際にどのような有機物が塩湿地の底生生物に分解され、栄養源として利用されているのかについては十分に解明されているとは言い難い。

特に、塩湿地にはメイオベントスと総称される小型の底生生物が非常に豊富に生息することが知られている。メイオベントスとは、海、湖および河川の底に生息するベントスと呼ばれる生物のうち、1 mm の篩を通過して 32~60 μm の篩に捉えられるものを指し、線形動物、環形動物、扁形動物、節足動物など 22 を超える動物門が含まれている。そして、それらの生息密度は 1 m^2 あたり 100 万個体以上とも言われている¹⁻³⁾。これまでメイオベントスに関する分類学的な報告はあるものの、その食性については僅かな情報しか得られていない。

そこで我々は、塩湿地におけるセルロースの分解の一部が、こういったメイオベントスによってなされているのではないかと考えた。前述のシロアリについては研究が進み、森林におけるセルロース循環への寄与が非常に大きいことが明らかになってきている。特に熱帯の森林や草原で生産されるセルロースの分解に対する彼らの寄与は、最大で 80%にも達すると見積もられている。もしメイオベントスにセルロース分解能が遍在するとすれば、その生息量からして、環境に及ぼす影響は非常に大きなものであると考えられる。水圏生態系においては、メイオベントスが森林のシロアリに相当する一大セルロース分解者である可能性も大きい。本研究では、こうしたメイオベントスのセルラーゼ活性を網羅的に解析するという生化学的なアプロ

ーチにより、彼らが水圏のセルロース分解に果たす役割の一端を明らかにすることを目的とする。

2. 材料および方法

2.1 干潟底泥のサンプリングおよびメイオベントスの抽出

2006年5月から2006年9月にかけて北海道根室市・風蓮湖及び浜中町・琵琶瀬川河口干潟、大阪市・淀川長柄橋及び十三大橋付近の干潟、加古川市・加古川河口干潟、滋賀県・知内川の計5地点でサンプリングを行った。サンプリングを行う干潟については、国立環境研究所による「干潟等湿地生態系の管理に関する国際共同研究」を参考にした⁴⁾。干潮時にコアサンプラー(直径3.5 cm、高さ3 cm)を用いて底泥を採集した。採集したサンプルは4°Cで保存し、研究室に持ち帰った。環境水あるいは人工海水を用いてかきまぜ法により生物試料を抽出し、目合い1 mmの篩を通過し、目合い40 μm の篩に残る画分を回収した。回収した生物試料をメイオベントスサンプルとし、環境水とともに4°Cで保存した。

2.2 セルラーゼ活性の測定

メイオベントスサンプルを用いて顕微鏡下でソーティング後、個々のメイオベントスは20 μl のリン酸バッファー(PBS)を加えてホモジナイズし、メイオベントス抽出液とした。また、メイオベントスを含む底泥に、1.5倍量のPBSを加え、ホモジナイズした。ホモジナイズした底泥を遠心分離にかけ、上清を回収し底泥抽出液とした。それぞれの抽出液を0.2%カルボキシメチルセルロース(CMC)(Sigma, St Louis, MO, US)を含むSDS/PAGEに供した。そして0.1% TritonX-100を含む10 mM酢酸バッファー(pH 5.5)によりSDSを取り除くためにゲルを30分間洗浄した。次にゲルを10 mM酢酸バッファー(pH 5.5)に移し、37°Cで一晩インキュベートした。ゲルに0.1% NaOHを500 μl 加えた後、0.1% Congo Red溶液で30分間染色した。最後に1 M NaClにより洗浄し、セルラーゼ活性バンドを検出した。

2.3 メイオベントス DNA 抽出

メイオベントスサンプルを用いて顕微鏡下でソーティング後、個々のメイオベントスを50 μl の10 mM KOHに入れ100°Cで20分間熱処理を行った。処理後、100 mM Tris-HCl(pH 8.0)を50 μl 加え、メイオベントス鑄型DNAとした。鑄型DNAはマイナス20°Cで保存した⁵⁾。

2. 4 PCR-RFLP 法によるメイオベントスの分類

メイオベントスの分類に利用するマーカー遺伝子領域は、真核生物の核にみられる28SリボソームRNA (rRNA)塩基配列を用いた。28S rRNA 遺伝子領域を増幅するためにユニバーサルプライマーを用いた。用いたプライマー配列は LSU1274: GACCCGTCTTGAAACACGGA および LSU689: ACACACTCCTTAGCGCA (Markmann et al. 2005) である⁶⁾。PCR 反応は Advantage2 polymerase (Clontech)を用いて 95°C 2分、95°C 30秒・55°C 1分・68°C 1分40サイクル、68°C 5分により行った。PCR産物に制限酵素 *Hae*III を加え、37°C 1時間インキュベートした。制限酵素処理を行った PCR 産物は1%アガロースゲル電気泳動に供し、バンドパターンを確認した。

3. 結果および考察

3. 1 各地点におけるメイオベントス

Fig. 1 に示した地域においてサンプリングを行った。また、各干潟の塩分濃度および干潟の様子について Table 1 に示した。1998～2000年に行われた国立環境研究所による「干潟等湿地生態系の管理に関する国際共同研究」⁴⁾において、干潟のセルラーゼ活性の報告がある。その中で北海道浜中町の琵琶瀬川で最も活性が高く、次に根室市の風蓮湖が高かったことから、両干潟でサンプリングを行った。また、河川内に大きな干潟を形成する大阪市の淀川と大きな河口干潟をもつ兵庫県の加古川においてもサンプリングを行った。さらに、淡水域のメイオベントスについても調べるために琵琶湖に流入する知内川においてサンプリングを行った。

風蓮湖は海に面した湖であり、塩分濃度はほぼ海水と同じである。風蓮湖内はアマモ場になっており、湖岸には大量のアマモが打ち上げられている。打ち上げられたアマモの下には砂質の底泥がある。琵琶瀬川は干潮時に河口から約750m上流に広い干潟が形成され、海水が常に流入しており、干潮時の塩分濃度は5～15%と変動が大きい。また、琵琶瀬川の干潟は細かい砂および粘土質であり、アサリ漁場になっている。淀川は、干潮時に河口から約12km上流に干潟が形成される。干潮時の塩分濃度は低く、両岸にはよし原がある。また、粘土質でありシジミが大量に生息している。加古川は河口干潟であり、塩分濃度は高い。知内川は琵琶湖に流入する河川のひとつで、琵琶湖の水位により河口に小さい干潟が見られる。よし原があり、河口域はアユの産卵場所にもなっている (Table

1)。

全ての干潟においてセンチウ類が観察されたが、その他にも環形動物(多毛類・貧毛類)や節足動物¹⁻³⁾なども認められた (Fig. 2, Table 2)。

3. 2 メイオベントスのセルラーゼ活性

ザイモグラフィ法により個々のメイオベントスにおいてセルラーゼ活性が認められた (Fig. 3)。風蓮湖において、観察された多くのセンチウ類にセルラーゼ活性が認められ、活性バンドのサイズは種類により異なるが、25 kDa の活性バンドは全てに認められた。また、1固体の中でも複数の活性バンドが検出された (Fig. 3A)。淀川において観察されたメイオベントスのうち、センチウ類にセルラーゼ活性が認められた。さらに、風蓮湖のセンチウ類の活性バンドパターンと非常に類似していた (Fig. 3B)。知内川において観察された貧毛類 (Fig. 2D) およびセンチウ類にもセルラーゼ活性が認められた。活性バンドサイズは約83 kDa であり、風蓮湖および淀川のメイオベントスとは異なるサイズであった。また、貧毛類において非常に強い活性が認められた (Fig. 3C)。

次に、個々のメイオベントスおよびメイオベントスを含む底泥抽出液のセルラーゼ活性を示す (Fig. 4)。風蓮湖において多く観察された貧毛類 (Fig. 2B) では32.5 kDa の活性バンドが認められた。また、風蓮湖の底泥抽出液と貧毛類の活性バンドサイズが一致した (Fig. 4A)。次に琵琶瀬川において多く観察されたハルパクチクス類 (Fig. 2C) では47.5 kDa の活性バンドが認められた。また、琵琶瀬川の底泥抽出液とハルパクチクス類の活性バンドサイズが一致した (Fig. 4B)。加古川において観察されたハルパクチクス類では約47.5 kDa の活性バンドが認められた。また、底泥抽出液においても弱い活性が認められた。しかし、風蓮湖および琵琶瀬川とは異なり、メイオベントスと底泥抽出液との活性バンドサイズが一致しなかった (Fig. 4C)。各干潟で観察されたメイオベントスおよびセルラーゼ活性の有無については、Table 2 に示した。

このように、センチウ類および一部の節足動物と環形動物にセルラーゼ活性が認められた。しかし、全く活性を示さないメイオベントスも多数存在した。最も強い活性は、風蓮湖の貧毛類および知内川の貧毛類から検出された。

一方、各干潟の底泥抽出液をザイモグラフィに供したところ、すべての干潟において複数の活性バンドが検出された。この結果は、各干潟においてセルロース分解に複数の酵素が関与していることを示唆していた。最も強

い活性は、風蓮湖および琵琶瀬川の底泥抽出液に認められた。

各干潟の優占種の活性バンドと底泥抽出液の活性バンドを比較した結果、風蓮湖と琵琶瀬川においては、底泥抽出液と優占種(貧毛類および節足動物)の活性バンドの位置が一致したが、淀川および加古川においては、両者のバンドパターンは一致しなかった。このことから琵琶瀬川及び風蓮湖の干潟のセルラーゼ活性は主にメイオベントスが担っており、その他の干潟のセルラーゼ活性はメイオベントス以外の生物、おそらくさらに微小な真核生物や細菌類が担っている可能性が推測された。

一般的に水温が低い地域では細菌類の数が少ないことが知られているが、本研究において風蓮湖と琵琶瀬川の泥抽出液と優占種の活性バンドの位置が一致したことは、寒冷地の干潟ではセルロースは主に環形動物や節足動物などのメイオベントスによって分解されている可能性を示唆するものであった。

3.3 メイオベントスの PCR-RFLP 法の確立

メイオベントスはその種類が多く、顕微鏡サイズであることから形態学的な分類が非常に困難である。さらに、日本周辺でのメイオベントスに関する研究は手付かず近く、種同定されていない新種のメイオベントスも数多く存在すると考えられている。そこで、簡便かつ短時間で行うことができる、DNA によるメイオベントスの分類方法の確立を目指した。これまでに1固体のセンチュウ類からのDNA抽出方法はいくつか報告されているものの、簡便とはいえず、特定の動物門(センチュウ類)を対象にしたものである。そこで本研究では、二枚貝幼生の種同定に用いられるPCR-RFLP(PCR-制限酵素断片長多型)法⁵⁾を応用し、より多くのメイオベントス類に用いることができるPCR-RFLP法を確立した。

PCR-RFLP法によるメイオベントスのバンドパターンをFig. 5に示した。貧毛類とセンチュウ類では異なるバンドパターンを示した。また、同じ貧毛類およびセンチュウ類でも異なるバンドパターンを示すものもあった。さらに、この方法をハルパクチクス類およびウズムシ類においても用いることができた。

4. 今後の研究課題

本研究により一部のメイオベントスにセルロース分解能があることが示唆され、彼らの水圏におけるセルロース分解に果たす役割の一端が明らかとなった。しかし、より詳細にセルロース分解能を持つメイオベントスの種同定にまで至らなかった。さらに、彼ら自身が持つ内源性のセルラーゼなのか、それとも彼らに共生している共生細菌の持つセルラーゼなのかについても明らかになっていない。今後これらの課題を明らかにするために、メイオベントスのセルラーゼ遺伝子の探索が必要になるだろう。

また、メイオベントスのPCR-RFLP法の確立は、多大な労力と時間を要する分類を簡便化し、まだまだ未知の生物群であるメイオベントスの研究にとって不可欠であるため、より種特異的バンドパターンを得るために増幅遺伝子領域および制限酵素の更なる検討が必要である。

参考文献

- 1) Robert P, H, Hjalmar T, Introduction to the Study of Mei fauna. Smithsonian Institution Press Washington, D.C. London 1988
- 2) 白山義久 無脊椎動物の多様性と系統 裳華房 2000
- 3) 日本線虫学会 線虫学実験法 2004
- 4) 独立行政法人国立環境研究所 「干潟等湿地生態系の管理に関する国際共同研究」 国立環境研究所特別研究報告 2003
- 5) Masatomi H, Shoko H, Hideki S, Masahiro U, Haruhiko T, Isao H: Sequence and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of the large subunit rRNA gene of bivalve: Simple and widely applicable technique for multiple species identification of bivalve larva. Fisheries Science 2004; 70: 629-637(9)
- 6) Melanie M, Diethard T: Reverse taxonomy: an approach towards determining the diversity of meiobenthic organisms based on ribosomal RNA signature sequences. Phil. Trans. R. Soc. B 2005; 360: 1917-1924.

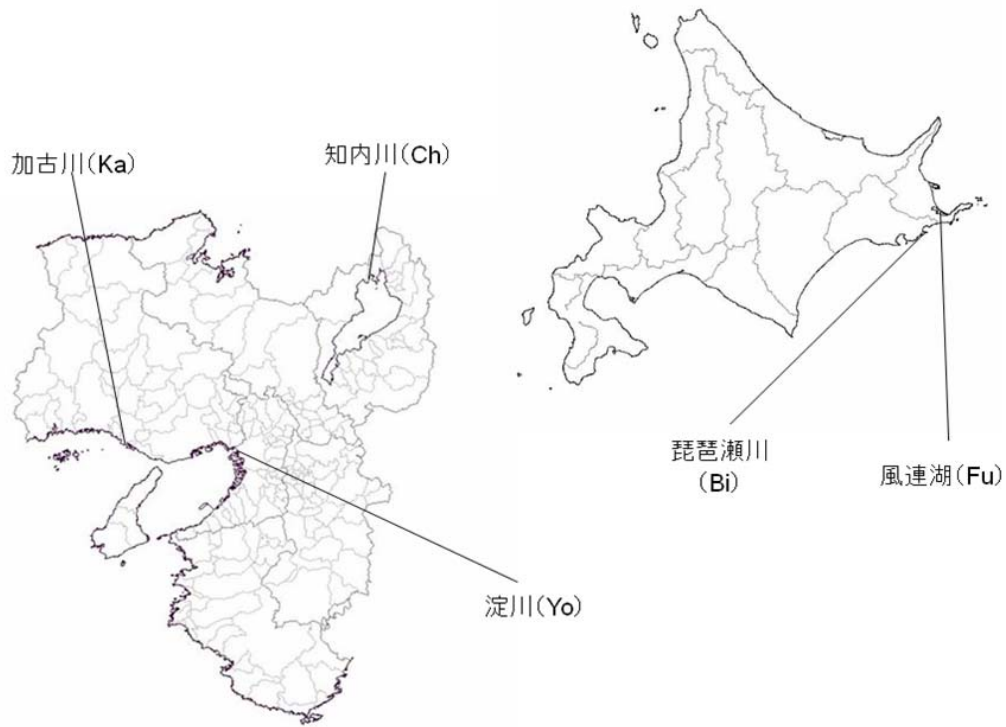


Fig. 1 各サンプリング地点を示す。各干潟については Table で示す。

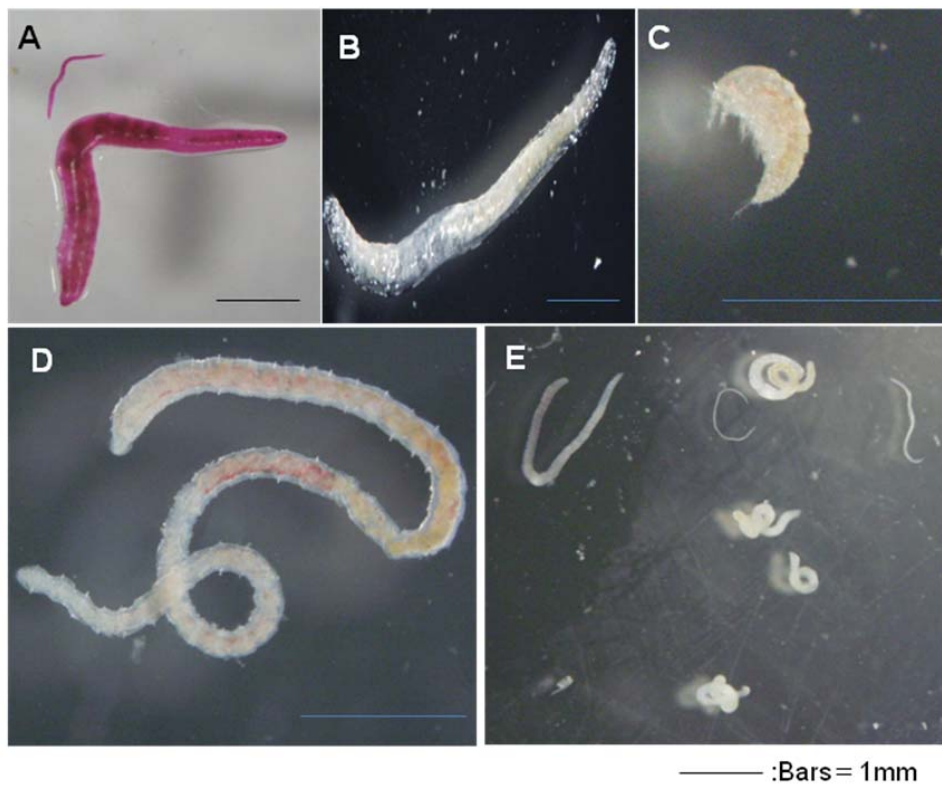


Fig. 2 各地点で観察されたメイオベントスを示す。

A: Yo 貧毛類(Oligochaeta) および Yo センチュウ類(Nematoda) (ローズベンガルにより赤色に染色済)、B: Fu 貧毛類(Oligochaeta)、C: Bi ハルパクチクス類(Harpacticoida)、D: Ch 貧毛類(Oligochaeta)、E: Fu 貧毛類およびセンチュウ類

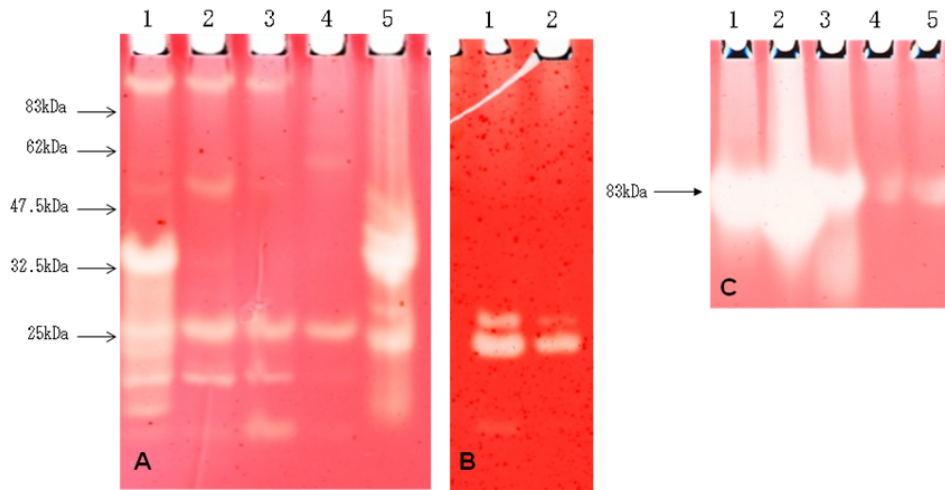


Fig. 3 ザイモグラフィーによるメイオベントスのセルラーゼ活性の測定

A: 風蓮湖(Fu)、B: 淀川(Yo)、C: 知内川(Ch)における個々のメイオベントスのザイモグラフィーによるセルラーゼ活性測定結果を示す。

A1~4 センチュウ類(Nematoda), A5 ウズムシ類(Turbellaria)

B1~2 センチュウ類(Nematoda)

C1~4 貧毛類(Oligochaeta), C5 センチュウ類(Nematoda)

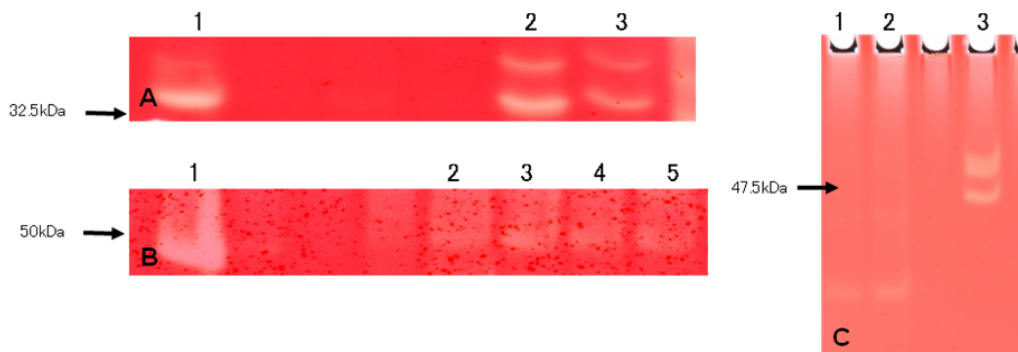


Fig. 4 ザイモグラフィーによる底泥およびメイオベントスのセルラーゼ活性の測定

A: 風蓮湖(Fu)、B: 琵琶瀬川(Bi)、C: 加古川(Ka)における底泥および個々のメイオベントスのザイモグラフィーによるセルラーゼ活性測定結果を示す。

A1 貧毛類(Oligochaeta), A2 底泥抽出液, A3 篩済み底泥抽出液, B1 ハルパクチクス類(Harpacticoida), B2 底泥抽出液,

C1・2 底泥抽出液, C3 ハルパクチクス類(Harpacticoida)

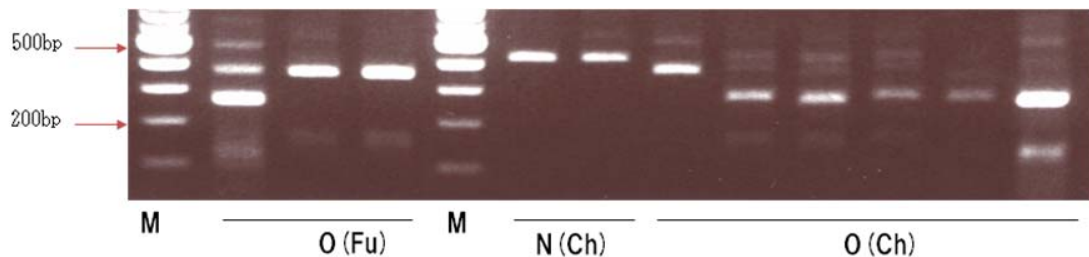


Fig. 5 PCR-RFLP 法によるメイオベントスのバンドパターン

M: マーカー, O(Fu): Fu 貧毛類, O(Ch): Ch 貧毛類, N(Ch): Ch センチュウ類を示す。

Table 1 Fig. 1 で示したサンプリングを行った各干潟の塩分濃度および干潟の様子を示した。

| | salinity concentration | description |
|----------|---------------------------|--|
| 風連湖(Fu) | 20~25‰ | 海に面した湖で、塩分濃度は高い。砂質でアマモが砂を覆っている。 |
| 琵琶瀬川(Bi) | 5~15‰ | 河口から約750mほど上流にある干潟。塩分濃度は潮位によって変動する。細かい砂、粘土質でアサリの漁場である。 |
| 知内川(Ch) | 0‰ | 琵琶湖に流入する川の一つ。よしがあり、砂質。 |
| 淀川(Yo) | 0~3‰ | 河口から約12km上流にあり、塩分濃度は低い。よし原があり、粘土質。シジミが非常に多く生息している。 |
| 加古川(Ka) | 25~28‰ | ほぼ河口にある干潟で、塩分濃度は高い。よし原があり、粘土質。カワニナが生息している。 |

Table 2 各地点で観察されたメイオベントスを示す。記号無しは、その地点で観察できなかったことを示す。各記号は、* : 観察のみ、○ : 観察およびセルラーゼ活性あり、◎ : その干潟で最も多く観察されたセルラーゼ活性あり。であることを示す。

| | Fu | Bi | Ch | Yo | Ka |
|---------------|----|----|----|----|----|
| Polychaeta | * | | | ○ | |
| Oligochaeta | ◎ | | ◎ | * | |
| Nematoda | ◎ | ◎ | ○ | ◎ | * |
| Harpacticoida | ○ | ◎ | | | ○ |
| Turbellaria | ○ | | | | |
| Ostracoda | * | * | * | | |

No. 0627

Cellulose Decomposing Ability of Intertidal Benthos

Haruhiko Toyohara, Park Young Hwa, Kentaro Sakamoto

Applied Bioscience, Graduate School of Agriculture, Kyoto University

Summary

Until recently, Cellulose had long been believed to be decomposed by quite listed organisms such as bacteria, fungi, protozoa, termite, and herbivorous animals. Especially, it has said that Cellulose derived from terrestrial plants and flown into aquatic environment is exclusively broken down by the activity of microorganisms. However, intrinsic cellulolytic ability has been discovered from marine mollusks, which let us to assume that unexpectedly large population of benthic animals living in tidal flat where substances of terrestrial origin accumulate actually have such ability. According to this hypothesis, we focused on small intertidal benthic fauna called “meiobenthos” and tried to detect their cellulose decomposing ability by biochemical methods.

We sampled tidal mud from five points in Japan and collected meiobenthos from these samples. Cellulase (cellulolytic enzyme) activities of individual meiobenthos or whole mud extracts were measured by zymogram analysis (Electrophoresis-based detection method of enzymatic activity). PCR-RFLP analysis was also carried out to sort out indistinguishable organisms belonging Nematoda or Annelida.

Nematodes were observed dominantly in all flats, and other organisms of Annelida or Althropoda were also found frequently. The cellulase zymographic bands were detected in some species of these three animal phyla, but not in the other ones. On the other hand, the mud extract from all five samples showed the multiple bands, suggesting the involvement of multiple cellulases in the cellulose degradation of each tidal flat. Comparing the band patterns of dominant species and mud extracts of each flat, there seemed to be a trend that both patterns were more identical in the samples from northern, thus cold region located in Hokkaido than that from southern region in Honshu. The PCR-RFLP method, though now in progress, have proved to be applicable for the species identification of Nematoda and Annelida animals. These results suggest that quite a few species of meiobenthos can contribute to the cellulose degradation in tidal flats, especially in that locates in cold region.