

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月24日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009-2011

課題番号：21380131

研究課題名（和文） 湿地帯におけるメイオベントスの生態学的機能に関する分子生化学的研究

研究課題名（英文） Biochemical studies on of ecological function of meiobenthos

研究代表者

豊原 治彦（TOYOHARA HARUHIKO）

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：90183079

研究成果の概要（和文）：南西諸島マングローブ湿地帯のセルロース分解機構を調査した結果、底泥のセルラーゼ活性のレベルには違いが認められた。貧毛類、線虫、ヨコエビ、介形虫などのセルロース分解を確認したところ、全てにおいてセルラーゼ活性が検出され、南西諸島マングローブ湿地帯のセルロース分解機構にメイオベントスが関わっていることが明らかになった。また、最も底泥の活性が高かったマーレ川について優占マクロベントスであるキバウミニナ *Terebralia palustris* の底泥中のセルロース分解に対する寄与を調べる為に糞を回収したところ、消化管と糞中のバンドの一部が一致した。以上の結果より南西諸島マングローブ湿地帯底泥のセルロース分解においてベントスの果たす役割が大きいことが明らかになった

研究成果の概要（英文）：

To determine the process of cellulose degradation in mangrove estuaries of the South-Western Islands, Japan, the cellulase activity of sediments was examined at a total of 9 sites on Okinawa Main Island (the River Gesashi and Manko), Ishigaki Island (Nagura Gulf and River Miyara), and Iriomote Island (rivers Urauchi, Mare, Hinai, Shira and Maira). Zymographic analysis was used to record cellulase activity in all sediment samples and in the meiobenthos. A 27-kDa cellulase activity band was expressed by several animal groups examined in the meiobenthos, including Gammaridea, Turbellaria, Ostracoda, Oligochaeta, Nematoda, and Polychaeta. However, the mangrove whelk, *Terebralia palustris*, which is a widely distributed member of the macrobenthos in these areas except Okinawa Main Island, expressed cellulase activities at 29, 31, 49, and 56 kDa. Interestingly, 31-kDa cellulase activity levels were recorded both in sediments and in the feces of *T. palustris*. The results of this study indicate that various benthic animals contribute to cellulose degradation in mangrove sediments of estuaries in the Southwestern Japanese Islands.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2009年度 | 6,000,000 | 1,800,000 | 7,800,000 |
| 2010年度 | 3,800,000 | 1,140,000 | 4,940,000 |
| 2011年度 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 13,400,000 | 4,020,000 | 17,420,000 |

研究分野：水産学

科研費の分科・細目：水産化学

キーワード：セルラーゼ・セルロース・メイオベントス・底泥・湿地帯

1. 研究開始当初の背景

干潟などの湿地帯には草木類に由来するセルロースを主成分とする陸起源有機物が多く集積する。湿地帯は古くから天然の浄化槽として陸起源有機物を分解する能力を有することが知られているが、この分解はおもにバクテリアや菌類などの微生物によるものと記述されてきた。例えば国立環境研究所が行った全国の湿地帯のセルロース分解能力調査では、北海道東部の風蓮湖と琵琶瀬川において顕著に強いセルラーゼ活性が検出され、この活性が土壌中に生息する微生物によるものと結論付けられていた。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究においては南西諸島マングローブ林に注目してセルロース分解に果たすメイオベントスの機能を生態学的手法のみならず、生化学的手法を用いて解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 調査地

下記の南西諸島の河口干潟および河口域において、干潮時に潮間帯の表層 5cm の底泥を採集した。採泥は沖縄本島、石垣島及び西表島の 12 湿地帯（マングローブ湿地 9 地点、前浜干潟 2 地点、淡水湖沼 1 地点）で行い、マングローブ湿地帯として慶佐次川河口、漫湖、名蔵湾、宮良川河口、浦内川河口、マーレ川及びヒナイ川河口、後良川河口、前良川河口を、前浜干潟として羽地内海、高那干潟を、淡水湖沼としては大正池をサンプリング地に選んだ。採集したサンプルは 4℃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 21) により生物試料を抽出し、目合い 1mm 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℃で保存した。また、生物試料を含むサンプル底泥を目合い 1mm の篩に通し、40 μm の篩に残る画分を回収し、メイオベントスを含む底泥画分とした。また、篩に通さない底泥そのものを、全底泥画分とした。

(2) ザイモグラフィー法によるセルラーゼ活性測定

メイオベントスサンプルより個々のメイオベントス個体を顕微鏡下でソーティングした。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、全底泥およびメイオベントスを含む底泥画分に 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 0.5%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。泳動後、0.1%TritonX-100 を含む 10mM 酢酸バッファー (pH5.5) 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 10mM 酢酸バッファー (pH5.5) に移し、37℃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 1M NaCl により脱色し、セルラーゼ活性バンドを検出した。

4. 研究成果

(1) 還元糖定量法による砂泥全体のセルラーゼ活性の測定

還元糖比色定量法で湿地帯底泥のセルラーゼ活性の定量を行った結果、マングローブ湿地帯であるマーレ川が最も高い活性を示し、次いで浦内川、名蔵湾、後良川とマングローブ湿地帯が比較的高いセルロース分解能を示した。しかし、マングローブ湿地帯の中にはヒナイ川 (1.40 ± 0.33 nmol/gh) や宮良川 (1.42 ± 1.41 nmol/gh) のように殆どセルロース分解能を示さないものもあった。また、前浜干潟については羽地内海が 7.22 ± 0.92 nmol/gh、高那干潟が 4.47 ± 0.13 nmol/gh と微弱な活性を示した。唯一の淡水湖沼である大正池は 8.25 ± 3.26 と微弱なセルラーゼ活性を示した。

(2) ザイモグラフィー法によるセルラーゼ活性測定

①底泥及びメイオベントス

SDS-PAGE ザイモグラフィー法により、セルロース分解能の定性的な評価を行った結果、全ての底泥よりセルロース分解能が確認された。メイオベントスについては慶佐次川の有孔虫類、名蔵湾の貧毛類、浦内川のヨコエビ類、ウズムシ類、介形虫類、マーレ川の貧毛類、ヒナイ川の線虫類、前良川の貧毛類及び高那干潟の等脚類からセルロース分解能が確認された。メイオベントスは全て 30 kDa 未満の低分子のバンドを示し、特に Fig. 14 に示すように浦内川のヨコエビ類、ウズムシ類及び介形虫類、マーレ川の貧毛類、ヒナイ川の線虫類はいずれも 27 kDa の分解バンドを示した。また、27 kDa の分子量バンドはこの 3 湿地帯において、底泥からも検出された。

②底泥、マングローブ残渣、キバウミニナ *Terebralia palustris* 生体及び糞

底泥は 260, 132, 103, 49, 27, 24 kDa と複数の分解バンドを示した。これに対してマングローブ木片は 103 及び 49 kDa の分解バンドを示した。キバウミニナ生体は 62, 56, 49, 31, 29, 27 kDa の分子量バンド、キバウミニナ糞は 83, 62, 56, 49, 31, 29 kDa 及び微弱な 27 kDa の分解バンドを示した。

(3) SDS-PAGEによるキバウミニナ中腸腺及び糞中のタンパク分子量の測定

キバウミニナ生体の中腸腺からは複数のタンパクバンドが検出された。しかし、そのうち糞中には49 kDaの分子量のタンパクのみが検出された。

(4) 考察

亜熱帯域湿地帯のセルロース分解能を明らかにする目的で、SDS-PAGE ザイモグラフィ分析を各湿地帯の底泥及びメイオベントスについて行ったところ、ほとんどの湿地帯底泥及びメイオベントスが低分子(27 kDa)の単調なセルラーゼバンドを示した。北海道湿地帯などほとんどの湿地帯底泥やメイオベントスは高分子から低分子まで様々な分解バンドを示すことが多く、このようにいずれの湿地帯も単調なバンドパターンを示すということは非常に珍しい。この理由として、マングローブ湿地帯では周辺の植生の殆どがヒルギ科植物であり、様々な種類の植物が周辺に繁茂する湖沼などに比べて、セルロース源となる植物が非常に単調であることが考えられる。また、今回調査を行ったマングローブ湿地帯では底泥の分解バンドとメイオベントスの分解バンドが低分子で一致したところが多かったが、このことはメイオベントスがマングローブ湿地帯において非常に重要なセルロース分解者であることを示している。

12 湿地帯のうち最大のセルラーゼ活性を示したマーレ川キバウミニナが群生していて、キバウミニナの糞と思われる緑色の塊が土壤中に散在していた。このことよりキバウミニナの糞が土壤のセルロース分解能の大きさに少なからず寄与している可能性が示唆された。この可能性を検証する為に行ったザイモグラフィ分析によるキバウミニナ中腸腺抽出液とキバウミニナの糞の比較では、両サンプルが比較的似たバンドパターンを示した。また、49 kDaのバンドは底泥及び底泥中のマングローブ木片、キバウミニナ及びその糞のいずれからも検出された。このことよりキバウミニナの糞に由来するセルラーゼが土壤のセルロース分解に寄与している可能性がより深まった。これをより明らかにするためにはキバウミニナ生体由来のセルラーゼ抗体を用いたウェスタンブロットなど免疫学的なアプローチが必要とされる。キバウミニナの糞から検出されたが中腸腺抽出液からは検出されなかった83 kDaのバンドは、キバウミニナの糞中に含まれる未分解のセルロース残渣を食物源とする微生物由来のセルラーゼの可能性があり、キバウミニナは自身でセルロースを分解するだけでなく、微生物によるセルロース分解の仲介者である可能性も示唆された。しかし、また、前述のようにほとんどの湿地帯底泥から検

出された27 kDaのバンドは、キバウミニナからは微弱なものとしてしか検出されなかった。したがって、底泥中セルラーゼバンドと各生物のセルラーゼバンドの比較でみる限り、マングローブ湿地帯の主要セルロース分解者はメイオベントスであると言える。このことは他湿地帯に比べてメイオベントスが多かった浦内川や、キバウミニナだけでなく貧毛類の個体数も非常に多かったマーレ川のセルラーゼ活性が比較的高かったという事実と合致する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

1. A. Tanimura, W. Limu, K. Yamada, T. Kishida, H. Toyohara: Animal cellulases with a focus on aquatic invertebrates. Fish Sci, 79, 1-13 (2013).
2. T. Niiyama, Y. Hanamura, K. Tanaka and H. Toyohara. Occurrence of cellulase activities in mangrove estuarine mysids and *Acetes* shrimps. JIRCUS Working Report 75, 35-40 (2012).

[学会発表] (計6件)

1. Validation of the breakdown activity of secreted cellulases from *Corbicula japonica* in sediment bioreactor system. (底泥バイオリクター系におけるヤマトシジミの分泌性セルラーゼの分解機能の検証)
W. Liu and H. Toyohara, 平成24年度日本水産学会秋季大会
2. 底泥バイオリクターシステムにおけるベントス排泄物由来酵素の役割, 豊原治彦・山田京平・谷村彩・劉文, 平成24年度日本水産学会秋季大会
3. Probiotic shrimp culture in Japan and Thailand - Utilization of Enzymes from Traditional Fermented Foods. H. Toyohara, W. Liu, Xuegang Li, Y. Araki, W. Salikput, K. Shiomi JSPS-NRCT Asian Core Program Symposium 2012

4. Determination of the “wetland sediments acting as bioreactors” hypothesis from the standpoint of the mechanism of Cellulose Binding Domain (CBD) of a cellulase of a brackish clam *Corbicula japonica*. W. Liu, S. Maegawa, H. Toyohara. JSPS-NRCT Asian Core Program Symposium 2012.
5. Cellulase activity of ocypodid crabs on the Tanakagawa tidal flat, central Japan. S. Kawaida, H. Toyohara, T. Kimura. The First Asian Marine Biology Symposium
6. Distribution of cellulase activities among the animals living in the Matang mangrove forest reserve, Malaysia. A. Tanimura, T. Niiyama, H. Toyohara, Y. Hanamura, K. Tanaka, Synposium on South China Sea 2012.

[その他]

ホームページ等

<http://www.mbf.marine.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊原 治彦 (TOYOHARA HARUHIKO)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：90183079

(2) 研究分担者：

笠井 亮秀 (KASAI AKIHIDE)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：80263127

(3) 連携研究者

上高原 浩 (KAMITAKAHARA HIROSHI)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：10293911