

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：12614

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14692

研究課題名（和文）優良真珠形成のための有用微生物の探索

研究課題名（英文）Screening for useful microorganisms for forming high-quality pearls

研究代表者

小林 武志（KOBAYASHI, TAKESHI）

東京海洋大学・学術研究院・准教授

研究者番号：60242327

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000 円

研究成果の概要（和文）：海水産真珠養殖では、高品質な真珠から低品質な真珠までが生産されてしまう。本研究では「真珠核の周囲に真珠層が形成する際に生ずる細菌による炎症反応が異常真珠の原因である」とする最近の学説を深く検討するため、主にアコヤガイ真珠の品質と細菌の関係を検討した。クローンライブラリーのデータでは真珠層の細菌叢は真珠の品質よりも貝の養殖ロットに関係しているようであった。

研究成果の概要（英文）：Formation of high- and low-quality pearls has been one of the critical issues in Akoya pearl farming for many years. In this study, to confirm a recent report that bacterial inflammatory reactions cause deformation and blemishing in pearls, we performed several experiments to clarify the relationship between pearl quality and microflora of the nacreous layer around the pearl nucleus. The results of clone library analysis suggest that the microflora of the nacreous layer is related to the farming lot, not pearl quality.

研究分野：応用微生物学

キーワード：真珠 細菌 アコヤガイ

1. 研究開始当初の背景

海水産真珠養殖の現場では、高品質な真珠から低品質な真珠までが生産されてしまうことが永年の課題である。実際の養殖真珠現場では、アコヤガイやクロチョウガイ、シロチョウガイを主な母貝とし、貝内部に外套膜小片と貝殻を球形に加工した核の挿入作業が行われる。真珠の品質では、大きさ、形態、色などが重要であり、特にシミや変形などは低品質真珠(異常真珠)と評価される。従来、異常真珠の原因は、精子や卵、脱落した組織の巻き込みや真珠袋の機能異常がもたらすと考えられてきたが、その一方で、異常真珠の形成に細菌が何か関与しているのではないかという疑いがもたれていた。このような中、本応募の研究協力者である荻村らは、核の周囲に真珠層が形成する際の細菌による炎症反応が異常真珠の原因であるとする学説を発表した(引用文献①)。この発見は、異常真珠の形成原因と形成機構の解明につながるものであり、微生物学の立場から十分に研究する必要があるが、詳細な検討はまだ行なわれていなかった。

2. 研究の目的

以上を背景に、海水産養殖真珠の品質と細菌の詳細な関係を明らかとし、その結果を真珠養殖に利用、貢献することを目的とした研究を行うこととした。本研究により、真珠の品質と細菌の関係が解明されれば、良質真珠や異常真珠を出現させる細菌叢が発見される可能性が考えられた。また、希少で高価な特殊真珠(バロック真珠など)の人為的生産にも繋がるような、従来とは異なる新規真珠養殖法が提案できる可能性もある。

3. 研究の方法

(1) 無菌的に真珠を破壊し、効率よく核の周囲の真珠層を得る方法について検討した。

(2) 養殖場から多数のアコヤガイを取り寄せ、真珠を取り出した。真珠を無菌的に破壊した後、市販の抽出キットを使用して核の周囲の真珠層から DNA を調製した。さらに 16S rRNA 遺伝子をターゲットとし PCR で DNA の増幅を行った。その後大腸菌を使用してクローンライブラリー法により細菌叢を検討した。

(3) 核の周囲の真珠層から生菌の分離を試みた。すなわち、好気条件と嫌気条件下において種々の寒天平板培地を使用し、破壊した真珠の真珠層から培養を試みた。実験は真珠層の核側が平板培地に極力触れるように行った。試料にはアコヤガイ真珠の他にクロチョウガイ真珠も使用した。

(4) アコヤガイの外套膜から、寒天培地を使用して細菌を分離した。養殖場における挿核手術の際に、斜面培地上の細菌コロニーをピース(移植用外套膜片)に植菌し、アコヤ

ガイ生殖巣に核と共に挿入して貝の養殖を行った。養殖試験は合計 4 回行った。また、一部の実験では比較の目的で、細菌接種(細菌区)、細菌未接種(対照区)のピース以外に抗生物質で処理を行ったピースも挿入した。これらのアコヤガイは養殖し、最終的に真珠を取り出して品質を鑑定した。

4. 研究成果

(1) 無菌的に真珠を破壊する器具については試行錯誤の結果、あらかじめ乾熱滅菌に付した金属製のボルトとナットの組み合わせが最良であった(図1)。すなわち、ナットの内部に真珠を入れ、両側からボルトにて締め上げることが最良であった。ピンセットやペンチの使用は困難であった。



図1 ボルトとナットの組み合わせ

(2) 養殖場から得たアコヤガイ真珠の品質は多様で、良質、変形、シミ、トッキ、クズ珠等に分類した(図2)。一部は光学顕微鏡による切片の観察を行った。

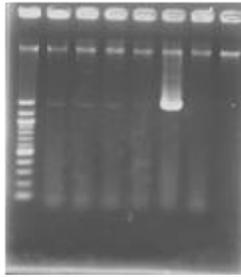


図2 養殖場から得た種々のアコヤガイ真珠

左上:良質、右上:変形、

左下:シミ、トッキ、右下:クズ珠

一方、真珠層 DNA からの PCR 増幅は非常に困難であった。そこで DNA 抽出の事例(引用文献②)を参考とし、真珠層にあらかじめ EDTA 処理を行った後に抽出を行うこととした。クローンライブラリー法により得られた真珠層の細菌 DNA 塩基配列には海洋細菌、芽胞形成菌やその他多様な菌種が認められた。また良質真珠の細菌叢は真珠ごとにばらばらであった。増幅された DNA の写真を示す(図3)。増幅されたバンドの濃さは非常に薄く真珠層の細菌数が少ないか、PCR 反応の阻害が示唆された。また、細菌叢は真珠の品質よりもその養殖ロットに関係しているようであった。



左より：
分子量マーカー、DNA 増幅産物 (4 レーン)、ポジティブコントロール、ネガティブコントロール

図3 アコヤガイ真珠層 DNA からの 16S rRNA 遺伝子の増幅

(3) 真珠層からの細菌培養実験 (図4) ではクロチョウガイ真珠から嫌気性および好気性の芽胞形成菌が分離された。光学顕微鏡の写真 (*Clostridium* 属) を図5に示す。アコヤガイ真珠からは細菌を分離することはできなかった。アコヤガイとクロチョウガイの結果の違いは真珠層の巻き始めの際の現場環境が影響している可能性がある。また、(2) のクローンライブラリー法で得られた真珠層の細菌叢は死菌であることが示唆された。

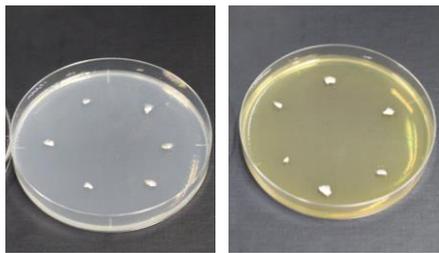


図4 各種平板培地上における真珠層の培養



図5 クロチョウガイ真珠層分離菌

(4) 養殖場における挿核手術の際に細菌をピースに植菌したところ (図6、図7)、養殖したアコヤガイが死亡したり、良質な真珠が得られにくい傾向となった。なお、抗生物質を使用すると良質な真珠が得られる場合が対照区よりも若干多い傾向にあるようであった。また、養殖場での実験は海況の影響を受けるため、さらに実験を繰り返す必要がある。



図6 養殖場で細菌を接種したアコヤガイ



図7 細菌を接種したアコヤガイの養殖

<引用文献>

- ① Tohru Ogimura, Kunihiko Futami, Takayuki Katagiri, Masashi Maita, Ana T. Gonçalves, Makoto Endo, Deformation and blemishing of pearls caused by bacteria, Fisheries Science, 78, 2012, 1255-1262
- ② Joana B. Meyer, Laurent E. Cartier, Eric A. Pinto-Figueroa, Michael S. Krzemnicki, Henry A. Hanni, Bruce A. McDonald, DNA fingerprinting of pearls to determine their origins, PLoS One, 8, 2013, e75606

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計0件)

〔学会発表〕 (計1件)

小林武志、荻村亨、優良真珠形成のための微生物学的アプローチ、市民真珠、海洋科学談話会-2017、鳥羽-

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 武志 (KOBAYASHI, Takeshi)
東京海洋大学・学術研究院・准教授
研究者番号：60242327

(2) 研究分担者

二見 邦彦 (FUTAMI, Kunihiko)
東京海洋大学・学術研究院・助教
研究者番号：00513459

片桐 孝之 (KATAGIRI, Takayuki)
東京海洋大学・学術研究院・准教授
研究者番号：50361811

寺原 猛 (TERAHARA, Takeshi)
東京海洋大学・学術研究院・助教
研究者番号：70547059
(平成28年度より追加)

(3) 研究協力者

荻村 亨 (OGIMURA, Tohru)