

氏名(本籍)	おお 大	さわ 澤	ろう 朗
学位の種類	博	士	(農学)
学位記番号	農	第	510号
学位授与年月日	平	成	7年2月9日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		

学位論文題目 Aspects of Tannin-Protein Complex
Degrading Bacteria in Mammalian Gut
Microflora
(動物腸内細菌叢由来, タンニン-蛋白
結合物質分解・資化性菌に関する研究)

論文審査委員(主査)	教授	扇	元	敬	司
	教授	伊	藤	敏	敏
	教授	秋	葉	征	夫
	助教授	中	井		裕

論文内容要旨

第1章 序論

フェノール化合物であるタンニンは大別して加水分解性タンニンと縮合（非加水分解性）タンニンに分類される。加水分解性タンニンはその中核に糖類（アルコール類、ブドウ糖）を持ち、それにフェノール酸（没食子酸、エラゲ酸等）がエステル結合した化学構造を持ち、酸、アルカリによって容易に加水分解される物質として一般に紹介されている。また加水分解性タンニンは土壤に分布する *Aspergillus*, *Candida* 等のカビ類が産生する加水分解酵素、タンナーゼによって分解されることが知られているが、動物の腸内に生息する細菌類について同様な分解能はこれまでに全く報告されていない。

タンニンは体外環境において蛋白質と容易に結合し水に不溶で既知の動物由来消化酵素では分解されない錯化結合物質を構成することが知られている。この為、タンニンが動物に摂取された場合、大半の食物蛋白質が未消化のまま糞便として排出されその動物の蛋白質消化率を著しく低下させてしまうことが過去の数々の研究によって明らかにされている。タンニンは植物の二次産物で特に双子葉植物に高濃度に含有され、このことから主に双子葉類を食べる草食動物（樹葉食動物）にはこの植物タンニンに対して腸内細菌を介するなんらかの生理学的「攻撃」機構がその消化システムに備えられているのではないかと考えられている。

そこで本研究ではタンニンを高濃度に含む双子葉植物、ユーカリを専ら喫食するオーストラリアの有袋動物、コアラを主被検動物として、その腸内細菌叢から加水分解性タンニン-蛋白質（Hydrolyzable Tannin-Protein Complex; 以下HT-PCと略）の消化を促進する腸内細菌を検索しその生態、分類、分解代謝経路を明らかにすることを目的とした。

第2章 タンニン酸とその蛋白結合物質に対する酸、アルカリ処理の影響

加水分解性タンニンの一種であるタンニン酸とその蛋白質（アルブミン、トリプトン）結合物質（HT-PC）、また遊離タンニン酸に対する酸、アルカリ処理の影響を調査した。水（pH 5.5）に不溶のHT-PCはpH 3以下あるいはpH 7以上（アルブミンとの結合物質について）またはpH 9以上

(トリプトンとの結合物質について)の処理によって解離し可溶性となる事が確認された。また遊離タンニン酸の没食子酸への加水分解はpH 6~9の処理領域で大幅な(60~70%減)認められたものの、pH 1~6の酸性領域ではほとんど認められなかった(図1)。これらの所見よりこの種のタンニンが胃酸分泌によって強い酸性環境におかれても加水分解されず胃以降の消化管内で再び蛋白と結合して、その部位での蛋白消化効率に影響を与える事が強く示唆された。

第3章 HT-PC分解性連鎖球菌の分離と生菌数測定用選択培地の開発

タンニン酸処理によって培地表面にHT-PCが形成され白濁したブレイン・ハート・インヒュージョン寒天培地(T-TBHIA)にコアラの新鮮糞便液を塗布しこれを嫌氣的に37°C、3日間培養した。培養後、培地表面にHT-PCの分解を示すクリアーゾーン付きの白色コロニーを形成する菌が分離された(図2)。この菌の形態、生化学性状を検査した結果、連鎖球菌群に属する*Streptococcus bovis*の biotype I (マンニトール分解型)と同定された。またこの培地にあらかじめ colistin-oxolinic acid を添加することによって更に選択性の高いHT-PC分解性連鎖球菌(以下T-PCDSと略)の生菌数測定用培地が開発された。

第4章 HT-PC分解性グラム陰性細菌の分離と生菌数測定用選択培地の開発

前章と同様にタンニン酸処理したWilkins-Chalgren寒天培地にコアラの新鮮糞便液を塗布し、これを微好氣的に37°C、3日間培養した。培養後、培地表面にクリアー・ゾーン付きのコロニーを形成する菌が新たに分離された(図3A)。その形態、生化学性状を検査した結果、これまでに分類記載されている既知の腸内細菌とは異なる多形性桿菌(図3Bおよび表1;以下T-PCDBと略)であることが明らかにされた。またこの培地に予め vancomycin を添加することによって更に選択性の高いT-PCDBの生菌数測定培地が開発された。

第5章 コアラの糞便細菌群によるHT-PCの分解・代謝の検索

第3章、第4章に紹介された2つのHT-PC分解菌についてこれらの菌群の縮合性タンニン-蛋白結合物質 (CT-PC)に対する分解能の有無を確認すると共に加水分解性タンニンとその分解産物である没食子酸にたいする代謝能を逆層クロマトグラフィーを用いて調べた結果、両菌群はCT-PCを分解しないがHT-PCを分解し没食子酸を放出するタンナーゼ活性を有する事、さらにこれらの菌群のほかコアラの腸内細菌叢を構成する他の菌に没食子酸を脱炭酸化しピロガロールに変換する代謝能を有する事が明らかにされた(表2)。またコアラの糞便からはピロガロールは全く検出されなかった。これらの所見より両菌群のHT-PC分解はその結合の解離によるものではなくタンニンそれ自体の分解に起因する事、また腸内細菌の共同した一連の働きによってタンニンが低分子に代謝される事が強く示唆された。更にT-PCDBの発育が没食子酸によって促進されること(図4)より、この菌が没食子酸を単に分解するのではなく積極的に資化することも明らかにされた。

第6章 各種動物糞便細菌叢におけるHT-PC分解菌の検索

第3章、第4章で延べられた研究によって開発された生菌数測定用選択培地を用いて異なる食性(草食、雑食、肉食)を示す総計15種の哺乳動物の糞便細菌叢におけるHT-PC分解菌の存在を調査した。その結果T-PCDBはコアラと馬から分離されたのみで、またT-PCDSは大半の動物から検出されたが、その検出率は若干の例外はあるものの、双子葉食性動物において高く、単子葉食性動物、雑食、肉食動物で低い傾向が認められた(表3)。またコアラ糞便の通性嫌気性細菌叢におけるT-PCDB、T-PCDSの占有率は各々62.9%、21.0%の高い値を示した。

第7章 没食子酸分解能を有する連鎖球菌属新種 *Streptococcus gallolyticus* の提案

第3章、第6章で述べられた研究より分離されたT-PCDS 及び他の研究者より提供された *S. bovis* 株また *S. equinus* 株、計31株についてそのマンニトール利用性、タンナーゼ活性、没食子酸脱炭酸代謝能の生化学性状とDNA相同性について比較検討した。その結果、没食子酸脱炭酸代謝能を有する株の1株を除いて総てがDNAの相同性の高い一群としてその代謝能を持たない *S. bovis* 及び *S. equinus* 株の一群と区別されることが明らかとなった(図5)。このことより没食子酸脱炭酸代謝能を有する *S. bovis* 株を新たな種、"*S. gallolyticus*" として分類学上扱うことを提案した。

第8章 タンナーゼ活性及び没食子酸資化性を有するグラム陰性通性嫌気性桿菌、新菌属、新菌種、*Lonepinella koalarum* の提案

第4章、第6章で述べられた研究より分離されたT-PCDBで生化学性状の若干異なる6菌株について、各々のDNA部分(16S ribosomal DNA)を Polymerase Chain Reaction (PCR)法によって増幅し、そのPCR産物のシーケンシングを行った。その結果、T-PCDBの総ての株がパストレラ科に属し、コアラから分離された菌3株の一群が新たな菌属、菌種に分類されることが明らかとなり(図6)、"*Lonepinella koalarum*" として分類学上扱うことを提案した。

第9章 コアラ盲腸壁における "*Lonepinella koalarum*" の局在性

コアラの糞便細菌叢の主構成細菌である "*L. koalarum*" についてこの菌のコアラ盲腸壁における局在性を検索するべく "*L. koalarum*" に特異的に反応するウサギ抗血清を作製し、これを用いて6頭のコアラの盲腸壁組織片について免疫ゴールド抗体染色を実施した。その結果6頭中5頭のコアラの盲腸壁を覆う細菌層に "*L. koalarum*" が局在している事が明らかにされた(図7A,7B)。また残る1頭のコアラは生存中にテトラサイクリ

ンによる抗生物質療法を施された個体で、この個体の盲腸壁では上記の様な細菌層が欠落していることが認められた。これらの所見より宿主であるコアラとその盲腸壁に局在する "*Lonepinella koalarum*" の間には HT-PC の分解・代謝に関して密接な「共生」関係が存在することが強く示唆された。

第 10 章 総合考察

これまで加水分解性タンニンは動物腸管内では胃酸によって分解され動物の蛋白消化効率にほとんど影響を与えないものと考えられていたが、本研究よりその様な酸処理では容易に分解されないことが明らかにされた。この知見は食物に含有される加水分解性タンニンの消化機能に対する影響に関し多くの研究者へ再考を喚起するものである。さらに加水分解性タンニンの微生物による分解はこれまでに一部のカビ類のみに認められていたが、本研究によってタンニンを分解・資化し分類学的にも新しい細菌が哺乳動物（主に樹葉食動物）の腸内に存在し、特にタンニンを高濃度に含有するユーカリを主食とする有袋草食動物コアラの盲腸ではその菌が「共生」的に存在することが初めて明らかにされた。これらの所見はセルロース、リグニン等の二次産物の「防御機構」により動物に「食べられまい」とする植物群と腸管内に生息する微生物の消化能に依存してその防御を打破し「食べよう」とする動物群、この両群の「攻防進化の歴史」をとらえる上で新しい知見を提供するものである。

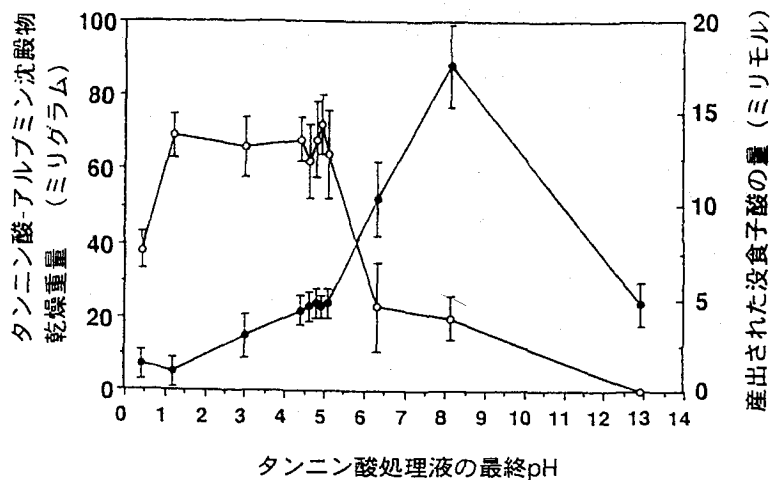


図1 酸、アルカリ処理後のタンニン酸のアルブミン沈殿量 (○) と加水分解によって産出された没食子酸量 (●)

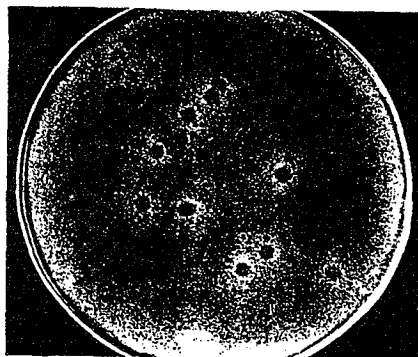


図2 タンニン酸処理し表面が白濁したブレイン・ハート・インヒュージョン寒天培地上に形成されたクリアー・ゾーン付きの連鎖球菌のコロニー (摂氏37度で72時間嫌気培養後)

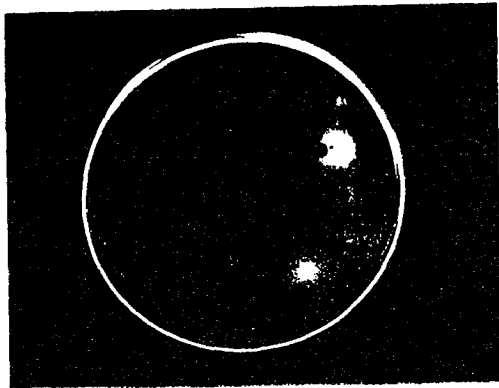


図 3 A タンニン酸処理し表面が白濁したWilkins-Chalgren Anaerobe 寒天培地上に形成されたクリアー・ゾーン付きのグラム陰性菌のコロニー (摂氏 37 度で 72 時間好気的培養後)



図 3 B タンニン-蛋白結合物質分解能を持つグラム陰性好気性桿菌 (T-PCDB)の顕微鏡写真 (グラム染色; 横棒は 20 μm)

表 1 コアラの糞便より分離された T-PCDB 株 (UQM 3666) と盲腸より分離された株 (UQM 3667) の生化学性状

生化学性状	UQM 3666	UQM 3667
マッコンキー培地上の発育	微弱	微弱
アンモニウム塩利用性	-	-
クエン酸利用性	-	-
硫化水素産生	-	-
インドール産生	-	-
Voges-Proskauer 反応	+	+
硝酸塩還元	+	+
運動性	-	-
酵素産生能:		
β-galactosidase	+	+
Arginine dihydrolase	-	-
Lysine decarboxylase	-	-
Urease	-	-
Tryptophan desaminase	-	-
Gelatinase	-	-
Oxidase	-	-
Catalase	-	-
糖分解能:		
D-Glucose (酸化的)	+	+
D-Glucose (発酵的)	+	+
Mannitol	-	-
Inocitol	-	-
Sorbitol	-	-
Rhamnose	+	+
Sucrose	+	+
Melibiose	+	+
Amygdaline	+	+
L-Arabinose	+	+
Glycerol	-	+
D-Arabinose	-	+
D-Xylose	-	+
Adonitol	+	-
Amidon	+	-
D-Arabitol	+	-
Gluconate	+	-

表2 各種菌の縮合タンニン-蛋白結合物質 (CT-PC)、加水分解性タンニン-蛋白結合物質 (HT-PC)、タンニン酸 (TA)、没食子酸 (GA)、ピロガロール (PY)、フロログルシノール (PH)、分解・代謝能

被検菌群	菌株	分解・代謝能						
		CT-PC	HT-PC	TA	GA	PY	PH	PH
T-PCDB	UQM 3666*	-	+	+	+	-	+	
	UQM 3667*	-	+	+	+	-	-	
T-PCDS	UQM 3546	-	+	+	+	-	+	
	UQM 3611*	-	+	+	+	-	+	
<i>Enterobacter agglomerans</i>	UQM 1615	-	-	-	-	-	-	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UQM 90	-	-	-	+	-	-	
	LPKS 104*	-	-	-	+	-	+	
<i>K. oxytoca</i>	LPKS 204*	-	-	-	+	-	-	
<i>Escherichia coli</i>	UQM 854	-	-	-	-	-	+	
	LPKS 110*	-	-	-	-	-	-	
	LPKS 112*	-	-	-	-	-	-	
<i>Streptococcus bovis</i> biotype II	UQM 3539	-	-	-	-	-	+	

注) 星印の付いた菌株はコアラの腸内細菌叢由来株

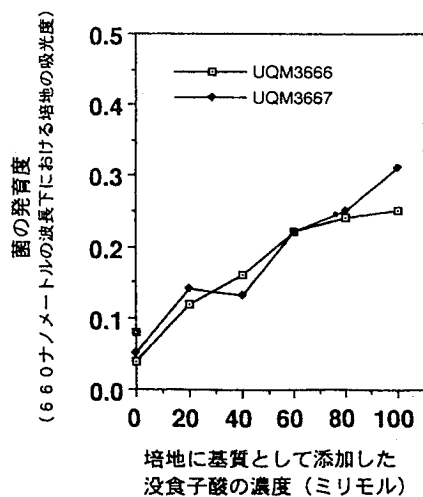


図4 異なる濃度の没食子酸を添加したNutrient brothにおけるT-PCDEの発育

表3 各種哺乳動物糞便におけるタンニン分解・資化性菌 (T-PCDS, T-PCDB)の生菌数、検出率の比較

動物種	食性	通性嫌気性細菌叢			総菌数に対する比率 (%)		
		T-PCDS	T-PCDB	総菌数	T-PCDS	T-PCDB	T-PCDB
コアラ	樹葉食	4.6 ± 1.1 ^a (11/15)	5.5 ± 1.2 (9/15)	5.8 ± 1.0	21.0 ± 8.6	62.9 ± 11.0	-
トリー・カンガルー	樹葉食	4.5 ± 3.0 (4/4)	- (0/4)	7.0 ± 1.7	29.5 ± 23.9	-	-
リング・テイル・ポッサム	樹葉食	4.3 ± 0.5 (5/6)	- (0/6)	7.7 ± 1.0	0.2 ± 0.1	-	-
ブラッシュ・テイル・ポッサム	樹葉食	4.5 ± 1.1 (6/6)	- (0/6)	7.5 ± 1.1	0.4 ± 0.2	-	-
カンガルー	草食	4.6 ± 2.5 (3/6)	- (0/6)	7.8 ± 0.2	10.4 ± 10.3	-	-
牛	草食	2.8 (1/6)	- (0/6)	6.7 ± 0.7	<0.1	-	-
羊	草食	- (0/6)	- (0/6)	7.3 ± 0.5	-	-	-
馬	草食	4.3 ± 0.2 (3/6)	5.5 (1/6)	8.1 ± 0.3	<0.1	<0.1	-
ウサギ	草食	- (0/6)	- (0/6)	5.7 ± 1.7	-	-	-
モルモット	草食・雑食	4.8 ± 0.9 (3/6)	- (0/6)	6.5 ± 0.3	2.9 ± 1.9	-	-
豚	雑食	6.4 ± 1.4 (3/6)	- (0/6)	8.4 ± 0.4	8.6 ± 8.2	-	-
マウス	雑食	- (0/6)	- (0/6)	9.3 ± 0.1	-	-	-
ラット	雑食	- (0/6)	- (0/6)	8.8 ± 0.1	-	-	-
犬	肉食・雑食	2.4 ± 0.3 (2/6)	- (0/6)	8.1 ± 0.5	<0.1	-	-
猫	肉食	- (0/6)	- (0/6)	7.7 ± 0.9	-	-	-

^a 該当する菌群が検出された例について糞便1グラムあたりの菌数の対数値の平均値の標準偏差

^b 該当する菌群が検出された個体数/総検査個体数

コアラ糞便由来タンニン分解性 *Streptococcus* sp. 株
UQM36111に対するDNAの%相同性

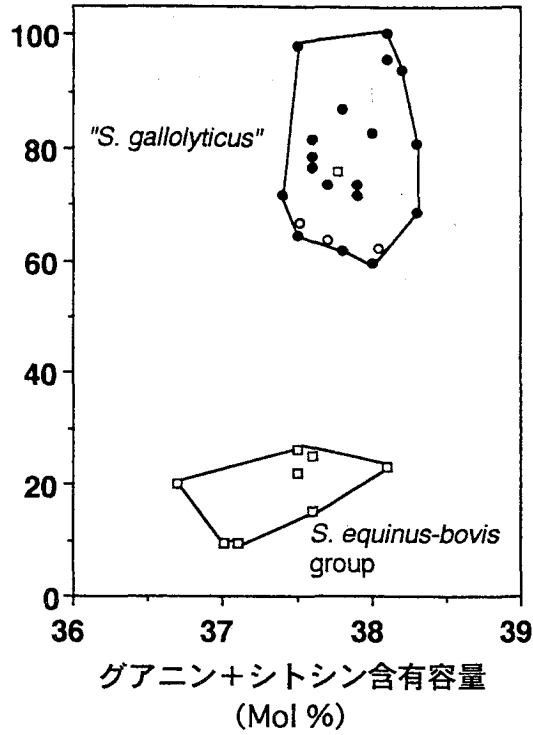


図5 菌体DNAの相異による *Streptococcus bovis* 及び *S. equinus* の新たなる分類

- : タンナーゼ活性、没食子酸脱炭酸酵素活性、マンニトール利用性を有する株
- : 没食子酸脱炭酸酵素活性のみを有する株
- : 上記のいずれの性状も持たない株

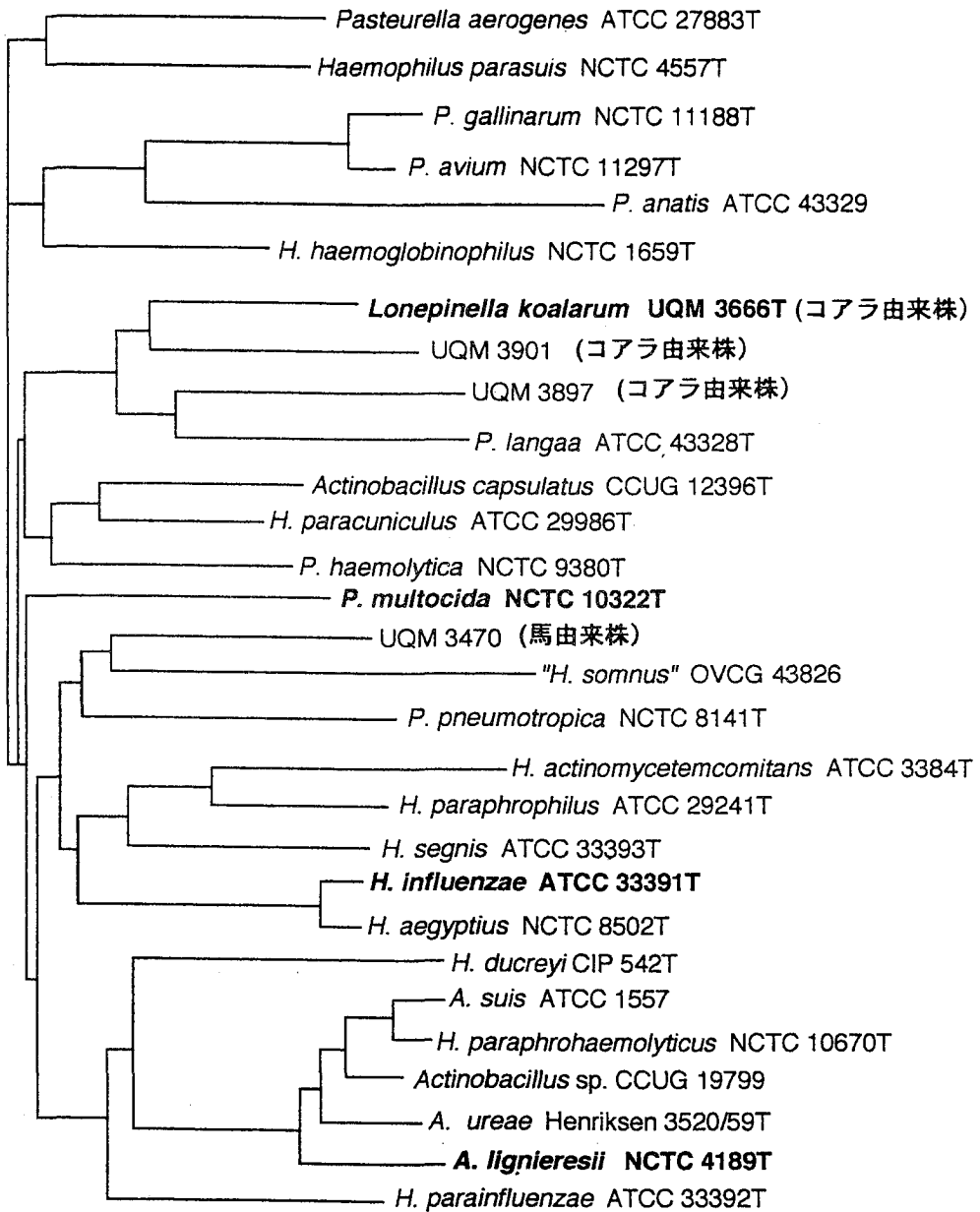


図6 パストレラ科の系統発生における "*Lonepinella koalarum*" 及びその他の動物腸内細菌叢由来のタンニン資化性グラム陰性桿菌の位置 (16S rDNA の配列決定法に基づく; 横棒は配列相異率 5% を表わす)

図7 免疫ゴールド染色法によって確認されたコアラ
盲腸壁に付着する細菌叢に局在する短棒状 (A) と糸状 (B) の
"*Lonepinella koalarum*" の菌群 (横棒は20 μ m)



A



B

論文審査の要旨

本論文は動物腸内細菌叢に由来するタンニン-タンパク質結合物質分解および資化性細菌に関する研究である。とくにタンニンを高濃度に含む双子葉植物ユーカリを専ら喫食するオーストラリア産有袋類コアラの腸内から加水分解性タンニン-タンパク質（以下HTPC）消化分解性細菌を分離同定して当該菌の分類学的生態学的研究を行ったものである。タンニン酸処理によって培地表面にHTPCが形成して白濁する寒天培地を新たに考案しコアラ腸管内容物を塗布し嫌気条件下で37℃、3日間培養した培地表面上にはHTPCを分類してクリアーゾーン付き白色コロニーを形成する菌が分離された。本菌は細菌学的検索の結果、連鎖球菌群に属する *Streptococcus bovis* biotype I（マンニトール分解型）と同定された。また一方タンニン酸処理した Wilkins-Chalgren 改良培地にコアラ腸管内容物を塗布し微好気条件下で37℃3日間培養すると培地表面にクリアー・ゾーン付きのコロニーを形成する未知の桿菌が分解された。この分離菌の形態を始めとする諸性状を検索したところ本菌は過去に記載されている腸内細菌とは異なる微好気性グラム陰性多形桿菌であることが明らかとなった。このような新たに分離同定された二種のHTPC分解菌の縮合性タンニンタンパク質結合物質に対する分解能の有無を確認すると共に加水分解性タンニン及びその分解産物である没食子酸に対する代謝能を検索した。両菌群はCTPCを分解しないがHTPCを分解して没食子酸を放出するタンナーゼ活性を有すること、されにこれらの菌群のほかコアラの腸内細菌叢を構成する他の菌に没食子酸を脱炭酸化しピロガロールに変換する代謝能を有すること、などが判明した。

さらにコアラ以外の各種の動物腸管由来菌叢中のHTPC分解菌の検索を行った。すなわち草食性などの食性の異なる15種の哺乳動物に存在するHTPC分解菌のうちグラム陰性多形桿菌はコアラおよびウマ腸管から分離されたのみで、多くの動物からは連鎖球菌のみが分離された。この傾向は双子葉食性動物において高くまた単子葉食性動物、雑食性、肉食性動物からは低かった。コアラ腸管菌数における連鎖球菌の占有率は62.9%、またグラム陰性多形桿菌は21.0%であり、精査をすすめた結果、この2種のHTPC分解菌は、いずれも新菌種であることが判明した。HTPC分解性連鎖球菌のマンニトール利用性、タンナーゼ活性、没食子酸代謝能などの生化学性状およびDNA相同性などの比較検討から、これまでの連鎖球菌とは異なる新菌種であることが確認された。そしてこの没食子酸能を保持しているHTPC分解性連鎖球菌は、新菌種 *Streptococcus gallolyticus* として分類することを提案した。またタンナーゼ活性及び没食子酸資化性を有するHTPC分解性グラム陰性多形桿菌はパストレラ科に属する新菌種として分解されることを明らかにした。そして新たなグラム陰性桿菌を *Lonepinella koalarum* とすることを提案した。コアラの腸管内主構成細菌である *Lonepinella koalarum* のコアラ盲腸壁における局在性を免疫染色によって検索した。その結果、コアラ盲腸壁を覆う細菌叢には多数の *Lonepinella koalarum* が局在していることを免疫形態学的に明らかにした。また抗生物質療法をおこなったコアラ盲腸壁では、この微生物叢の欠落が観察された。これらの所見から宿主動物コアラと盲腸壁に局在する *Lonepinella koalarum* の間には、HTPCの分解および代謝に関して密接な共生関係が存在することが強く示唆された。このように動物消化管中の胃酸によってのみ分解されていたタンニンが腸管内で微生物分解を受けること、さらにこのタンニン分解性菌は、タンニンを主成分とするユーカリを主食とする有袋草食動物コアラ盲腸粘膜では宿主動物と共生関係にあたることを初めて明らかにした。これらの知見は動物食性と腸管微生物叢の関係の解明および細菌分類学に大きく貢献して動物微生物科学研究に進歩を与えたものである。よって審査員一同は、本論文提出者が博士（農学）の学位を授与されるに十分な資格を有するものと認定した。