

ウグイス糞の諸特性と細菌叢の解析とその利用

筑波大学生命環境系

青柳 秀紀

Fecal matter of *Horornis diphone* has been used as a cosmetic (facial cleanser and skin stain remover, etc.) for the last 1,000 years until recently. Due to the enforcement of the Law for the Protection and Management of Birds and Animals, it has become difficult to obtain fecal matter and to manufacture the cosmetic products utilizing this component. The mechanism of the cosmetic effects of feces of *H. diphone* has been little investigated, and one of the main components of the feces (the intestinal microflora) is still unknown. In this study, I attempted to analyze the properties of feces as well as the intestinal bacterial flora present in the feces of *H. diphone*. Elemental analysis of the fecal matter showed that the nitrogen content of the feces was higher than that of their feed. This suggests that the feed is digested and degraded as it passes through the digestive tract of the warbler and that the feces may contain proteins such as enzymes. In addition, the fecal matter exhibited weak activity of protease and trypsin, and also possessed antioxidant activity. Next-generation sequencing was used to analyze the intestinal bacterial community structure in the fecal matter of *H. diphone*. Analysis at the genus level, *Lactococcus*, *Macroccoccus*, and *Weissella* were detected as abundant bacteria.

1. 緒言

ウグイス (*Horornis diphone*) は日本全域に分布し、その糞は化粧品(洗顔料)や肌のシミ抜きとして古くは平安時代(1,000年以上前)より用いられ、海外にも輸出版売されてきた。1980年、鳥獣保護管理法によりウグイスの捕獲や飼育は禁止され、糞の入手が困難となった。その後、ウグイスの代わりにソウシチョウ (*Leiothrix lutea*)、メジロ (*Zosterops japonicus*) の糞を使用して類似の化粧品の製造販売がなされてきたが、2002年の鳥獣保護管理法により捕獲や飼育は禁止され、糞の入手が困難となり、製造ができなくなった。

ウグイス糞が化粧品として使用されてきたことはよく知られているが、“なぜ、ウグイスの糞が優れた化粧品機能を示すのか?”については学術的に解明されておらず未知な部分が多い。一つの説として、ウグイスは昆虫食であるため、腸内で強いタンパク質分解酵素が分泌されており、消化管が短いため、消化酵素(プロテアーゼ)が糞に含まれ、それがヒトの肌に作用していることが言われている。さらに、ウグイスの糞の主な要素である細菌叢(腸内由来)についても未解明である。

このような現状を踏まえ、私はウグイスの糞に興味を持ち、これまで未解明であったウグイスの糞が化粧品機能を示す仕組みを解明し、その知見を活用・模倣することがで

ければ、現在は入手困難なウグイスの糞に代わる、より優れた新規化粧品(素材)を開発できるのではないかと考えた。さらに私は、ウグイス糞に含まれる微生物(腸内細菌)が化粧品機能に関与しているのではないかと考えた。

以上の背景を基盤に本研究では、ウグイスの糞が化粧品の効能を示す機構の解明とその利用を最終目的に、今回はその基礎として、ウグイス糞の諸特性と糞の主要な要素である細菌叢(ウグイス腸内細菌由来)の解析と培養化を試みた。

2. 方法

2.1. ウグイスの糞の成分元素分析と諸活性の測定

任意の量のウグイスの糞をオートクレーブ滅菌後、凍結乾燥した試料のC、H、N元素量を、2400 II CHN Elemental Analyzer (Perkin-Elmer)を用いて定量した。

ウグイスの糞のプロテアーゼ活性の測定は、1% (w/v) カゼイン溶液に種々の濃度に希釈した糞の試料液を加えて混和後、37℃、30 min 反応させた。5% (w/v) トリクロロ酢酸(500 μL)を加えて反応を停止させた後、遠心分離を行い、その上清の吸光度(A_{280})を測定した。1 min あたり A_{280} を1上昇させる反応液全体のプロテアーゼ量を1Uと定義した。

ウグイスの糞のトリプシン活性の測定は、96 ウェルプレートに、100 mM Tris·HCl (pH8.0) + 0.1% Tween 20 を60 μL、種々の濃度に希釈した試料液を30 μL、100 μM MCA (蛍光基質: Boc-Gln-Ala-Arg MCA [Peptide Institute]) 溶液を90 μL 添加し、37℃、30 min 反応後、遊離したAMC (7-Amino-4-methylcoumarin) の蛍光強度(励起波長355 nm、測定波長460 nm)を測定した。活性は1 nmolのAMCが1分間に遊離する量を1 mLあたりに換算し、1 mUと定義した(1 mU = 1 nmol AMC/min/mL)。



Characteristics and bacterial flora of *Horornis diphone* fecal and its utilization

Hideki Aoyagi

Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

ウグイスの糞の抗酸化活性はDPPHラジカル消去活性に基づき測定した。

2. 2. 次世代シーケンサー (MiSeq) によるウグイスの糞の細菌群集構造解析

ウグイスの糞試料をQuickGene DNA tissue kit S (Kurabo) を用いて調製後、Quick Gene-Mini80 (Kurabo) でDNAを抽出した。16S rRNA 遺伝子のV4領域を増幅するため、1st_PCR_515Fプライマーと1st_PCR_806Rプライマー、ExTaq HS DNA Polymerase (Takara Bio) を用いて1段階目のPCR反応をおこなった。PCR産物をAMPure XP ビーズ (Beckman Coulter) で精製し、20 μ Lで溶出した。さらに、溶出液2 μ Lを鋳型とし、MiSeqでの解析に必要な共通配列とサンプル識別をおこなうためのMID配列でデザインされたプライマーを用いて、20 μ Lの反応系で2段階目のPCRを行った。PCR産物を再び、AMPure XP ビーズ (Beckman Coulter) で精製し、20 μ Lで溶出しMiSeqでペアエンドシーケンシングした。MiSeqから得られたリードデータは以下の①～③の基準に基づき、sickle ver 1.33を用いてフィルタリングをおこなった。①両鎖の読み始めがプライマーと完全一致する配列であること、②プライマー領域、および低精度配列のトリムをおこない両鎖とも規定以上の長さを保っていること、③両鎖が結合できること。Fastx toolkit ver 0.0.13.2を用いて低品質の塩基対を除去した。トリミングしたリードはFLASH ver 1.2.10を用いてペアエンド結合した。キメラ配列チェックにはUSEARCH ver 8.0.1623_i86linux64を用いた。微生物群集構造はQIIME ver 1.9.0を用いて分析した。配列は相同性97%を基準とし、操作的分類単位 (Operational Taxonomic Unit=OTU) にクラスタリングし、Greengenes databaseに基づいて分類学上の決定をおこなった。

3. 結果および考察

成分元素分析の結果を表1に示した。C(炭素)は約0.78倍、H(水素)は約0.77倍に減少していた。一方、N(窒素)は約1.35倍に増加していた。窒素はタンパク質や酵素の構成元素である。今回の結果から、消化管を通る間に糞に窒素源であるタンパク質や酵素などが含まれた可能性が考えられた。

ウグイスの糞のプロテアーゼ活性とトリプシン活性を測定した結果、それぞれ約11.8U/mg、1.75U/mgの活性が

得られた。一方、ウグイスの餌のプロテアーゼ活性やトリプシン活性を測定した結果、いずれの活性も検出されなかった。この結果は、ウグイスの餌が消化管内を通過する間に、プロテアーゼやトリプシンが糞に含まれることを示唆している(現在、プロテアーゼやトリプシンが腸内で分泌される消化酵素由来なのか?、糞に含まれる腸内細菌由来なのか?、について解析中である)。今回、得られたウグイスの糞のプロテアーゼやトリプシンの活性は高くはなく、これまで、ウグイスの糞が化粧品品の効能を示す一つの説として、ウグイスの消化酵素(プロテアーゼ)が糞に含まれていることが言われてきたが、その真偽については引き続き検証する必要がある。

ウグイスの糞のDPPHラジカル消去活性に基づく抗酸化活性を測定した結果、ウグイス糞の懸濁液の抗酸化活性は125～500 μ g/mLで容量依存的に増加したが、アスコルビン酸のIC₅₀値(DPPHを50%消去できる濃度)と比較した場合、その活性は1/60程度の低いものであった(ウグイスの餌には抗酸化活性はほとんど検出されなかった)。

次世代シーケンサーを用いてウグイスの糞に含まれる細菌群集構造を属レベルで解析した結果、14試料から計74属が検出された(図1)。優占属は、*Lactococcus* (22.43%)、*Macrococcus* (14.73%)、*Weissella* (14.39%)、*Leuconostocaceae* 科の同定されなかった属(14.19%)であった。しかしながら、試料によってその存在比は大きく異なった(*Lactococcus*で2.3～60.8%、*Macrococcus*で2.9～41.3%、*Weissella*で0.2～50.4%、*Leuconostocaceae* 科の同定されなかった属で0.2～29.0%)。ウグイスの糞に含まれる細菌叢は腸内由来の細菌であることが考えられる。これまで国内外を通じて野鳥の腸内細菌(叢)に関する研究は少なく¹⁻³⁾、ウグイスについては初めての報告である。

また、種々の寒天平板培地を用いてウグイスの糞に含まれる細菌の単離培養を試みたところ、ウグイス糞に存在する全微生物の0.5%程度の種類しか単離培養できなかった。また、ウグイスの糞の試料からプロテアーゼ産生細菌を対象に、単離培養を試みた結果、16種類の細菌の単離培養に成功したが、いずれも次世代シーケンサーを用いた細菌群集構造解析において存在比が非常に低い細菌のみであった。

以上の結果から、ウグイス糞中には未培養微生物が多く存在していることが示唆され、今後、これらの未培養微生物の培養化が求められる。現在、ウグイス糞からの細菌の培養効率の向上や、毒素除去能、メラニン生成抑制能、皮膚炎症抑制能、バイオサーファクタント生産能、金属ナノ粒子の生成能などの機能を有する新規細菌の培養化、取得についても検討中である。

表1 ウグイスの餌と糞の元素分析

| 試料 | 含量 (w/w %) | | |
|----|------------|------|------|
| | C | H | N |
| 餌 | 44.72 | 7.10 | 4.90 |
| 糞 | 35.00 | 5.48 | 6.60 |

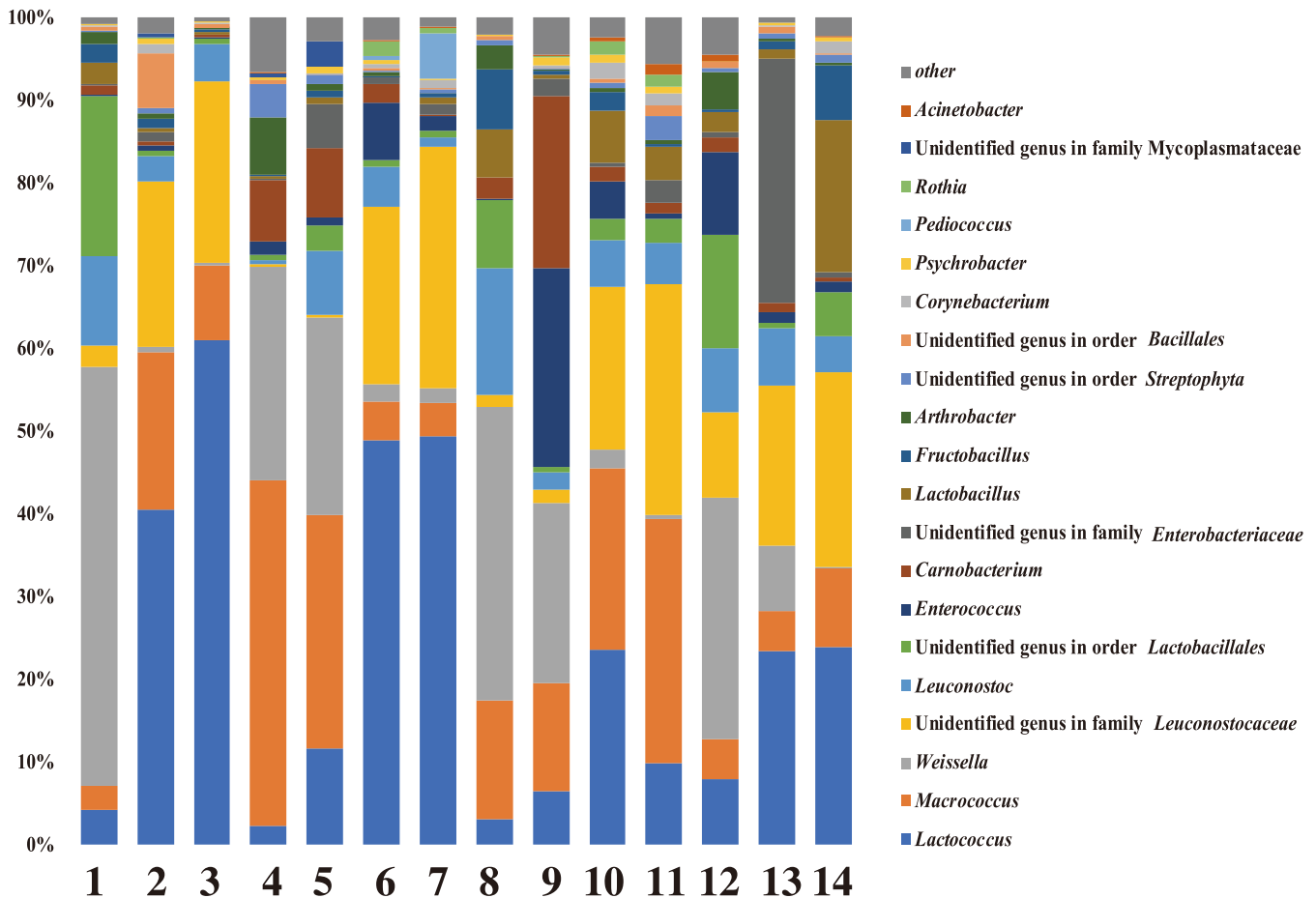


図1 次世代シーケンサー (MiSeq) を用いたウグイスの糞に含まれる属レベルでの細菌群集構造の解析.

4. 総括

ウグイスの糞は洗顔料やシミ抜きとして古来より国内外で商業利用されてきたが、これまで学術的検討が乏しく、その諸特性や糞の主要な要素である細菌叢(ウグイス腸内細菌由来)は未解明であった。本研究において、これまで未解明であったウグイス糞の諸特性や腸内細菌群集構造をはじめ解析し、その一端を明らかにした。今後、本研究成果を基盤に研究を推進することで、ウグイス糞が化粧品機能を示す仕組みの解明や有用な新規微生物の取得が期待できる。さらに、得られた知見を模倣したり、取得した有用微生物を活用することで、現在は入手困難なウグイスの糞に代わる、より優れた新規化粧品(素材)の開発が期待できる。

(引用文献)

- 1) Waite, D. W., Taylor, M. W. Characterizing the avian gut microbiota: membership, driving influences, and potential function. *Frontiers in Microbiology*, **5**, 223 (2014).
- 2) Ushida, K., Segawa, T., Tsuchida, S., Murata, K. Cecal bacterial communities in wild Japanese rock ptarmigans and captive Svalbard rock ptarmigans. *The Journal of Veterinary Medical Science*, **78**, 251-257 (2016).
- 3) Wang, W., Zheng, S., Sharshov, K., Cao, J., Sun, H., Yang, F., Wang, X., Li, L. Distinctive gut microbial community structure in both the wild and farmed Swan goose (*Anser cygnoides*). *Journal of Basic Microbiology*, **56**, 1299-1307 (2016).