

2019年度 杉山産業化学研究所 研究助成成果報告書

大阪府立大学 大学院生命環境科学研究科 三浦夏子
『新規サンゴ常在菌の分子育種によるサンゴ保護物質の生産』

【背景と目的】

海洋の中でも最も生物多様性に富んだ領域の一つであるサンゴ礁において、サンゴの共生微生物は様々な生理活性物質を産生することが知られている (Bourne et al, 2016)。ある種のサンゴ共生微生物は、サンゴ病原菌である *Vibrio coralliilyticus* に対するクオラムセンシング物質である Tropodithietic acid (TDA) を産生することで、病原菌の生育を抑制すると考えられている。TDA は現在に至るまで、サンゴ共生微生物により生産される唯一の抗 *V. coralliilyticus* 物質である。一方で TDA は安定性が低く、実用化には至らないという問題があった。近年、サンゴ共生微生物の中には、*Vibrio* 属細菌等の病原菌に対する抗菌物質を生産する細菌が含まれることが示唆されてきた。我々が見出した新規な *Ruegeria* 属細菌 (Miura et al. 2018) は、高分子の抗菌物質を生産することが分かっているほか、65 度の熱処理に対しても安定であり、サンゴ保護に向けた菌体及び抗菌物質の利用が期待できる。これまでに、*Ruegeria* 属細菌を物質生産の宿主として利用する試みとして、アメリカ・ジョージア州沿岸の海水から単離された *Ruegeria pomeroyi* DSS-3 株について、古典的な手法による遺伝子組換えが可能であることが示されている。しかし、DSS-3 株はサンゴ病原菌に対する抗菌活性は示さない。我々が単離した抗菌活性を示す *Ruegeria* 属細菌は、*R. pomeroyi* に比べて、一般的な培養用培地において良好な生育を示す。また、当該株は *R. pomeroyi* と近縁種であることから、*R. pomeroyi* で用いられた手法を、サンゴに共生する *Ruegeria* 属細菌の育種法開発にも生かすことができると考えられる。

本提案研究では *Ruegeria* 属細菌の遺伝的育種によって海洋細菌由来の新規な有用物質生産宿主を開発する方法を検討することで、将来的に病原菌からのサンゴ保護に資する抗菌薬開発プラットフォームの構築を可能とすることを目指した。

【方法と結果】

1. 抗菌薬開発プラットフォームとして利用可能な新規 *Ruegeria* 属細菌の取得方法検討

以前にサンゴから単離した *Ruegeria* 属細菌は既に公知であるため、新たに抗菌薬開発プラットフォームとして多様な用途で利用可能な新規 *Ruegeria* 属細菌の取得方法を検討した。従来の方法では微生物の単離ライブラリをまず作成し、そこから目的の 16S rRNA 配列を有する微生物を探索してきたが、目的とする微生物の単離を簡便且つ迅速に行うために、コロニーPCR をベースとした新たな手法を検討した。具体的には、サンゴに共生する *Ruegeria* 属細菌特異的なプライマーセット2種を開発し、このプライマーセットを用いて環境中から *Ruegeria* 属細菌の検出・取得が可能であることを示した (発表論文1)。

2. *Ruegeria* 属細菌の *de novo* ゲノム解析

サンゴに共生する *Ruegeria* 属細菌について、これまでにゲノム解析は行われていない。そこで Illumina Miseq を用いて *de novo* ゲノム解析を行った。取得した配列情報は、FASTQ を用いてクオリティチェックを行い、Velvet を用いてアセンブリしたのち、Medusa により *Ruegeria* sp. 5 種の既知ゲノムを参照してアライメントを行った。アノテーションには DFAST を用いた。その結果、ゲノム既知の *R. pomeroyi*

DSS-3 株（ゲノムサイズ 4.6 M, GC 含量 64.1%）に近いゲノムサイズを持つ新規な *Ruegeria* 属細菌のゲノム配列を得た。得られた配列情報を DSS-3 株と比較したところ、抗菌活性を示す *Ruegeria* 属細菌では特異的な機能をもつ遺伝子が存在することが示唆された。

3. *Ruegeria* 属細菌の育種に使用するプラスミド及び形質転換条件の検討

Ruegeria 属細菌に対する遺伝子導入手法について検討を行った。具体的には、種々の培地を作成し、最適な培地組成と選抜条件を決定した。また、プラスミド pK18mobsacB（国立遺伝学研究所）を用い、ヒートショックあるいはエレクトロポレーションにより *Ruegeria* 属細菌における最適な形質転換手法を検討した。その結果、エレクトロポレーションにより形質転換を行ったとき、適当な培地条件において *Ruegeria* 属細菌が良好に選抜可能であることを示すことができた。

【まとめと今後の展望】

本研究では抗菌薬開発プラットフォームとして利用可能な *Ruegeria* 属細菌の遺伝的育種に向けて、新規な宿主の選抜手法と形質転換条件を開発するとともに、これまで未知であったサンゴに共在する *Ruegeria* 属細菌の *de novo* ゲノム解析を行った。今後はこうした知見を組み合わせ、さらに研究を進めることで、国産の新規な *Ruegeria* 属細菌を基盤として、サンゴ病原菌を含む *Vibrio* 属病原菌に対する抗菌物質の高生産株を開発することが可能になると考えられる。

【謝辞】

本研究を実施するにあたり、2019 年度 杉山産業化学研究所研究助成より多大なる補助を頂きました。この場を借りて、厚く御礼申し上げます。

【論文発表】

1. Kitamura R, **Miura N***, Okada K, Motone K, Takagi T, Ueda M, Kataoka M. Design of novel primer sets for easy detection of *Ruegeria* species from seawater. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2020;84:854-864.

【学会発表】

1. 北村 瑠璃子, **三浦 夏子**, 岡田 圭以子, 元根 啓佑, 高木 俊幸, 植田 充美, 片岡 道彦. *Ruegeria* 属細菌の分布調査を目的とした環境 DNA 検出法の検討. 日本農芸化学会西日本・中四国支部合同大会（第 55 回講演会）2019 年 11 月 9 日
2. 北村 瑠璃子, **三浦 夏子**, 岡田 圭以子, 元根 啓佑, 高木 俊幸, 植田 充美, 片岡 道彦. *Ruegeria* 属細菌の分布調査を目的とした環境 DNA 検出法の検討. 第 2 回環境 DNA 学会神戸大会 2019 年 11 月 4 日
3. **Natsuko Miura**, Keiko Okada, Keisuke Motone, Toshiyuki Takagi, Mitsuyoshi Ueda, Michihiko Kataoka. Features of antibiotic activity against *Vibrio coralliilyticus* by coral-associated *Ruegeria* sp. Joint Conference of the 12th International Marine Biotechnology Conference and the 12th Asia Pacific Marine Biotechnology Conference 2019 年 9 月 12 日