

2020 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

『国産プロバイオティクスの開発を目指したサンゴ共生細菌の分子育種』

【背景と目的】

本提案研究では、海洋の有用物質産生菌として注目される海洋細菌の中でも、我々が新しく見出したサンゴ病原菌に対する抗菌活性をもつサンゴ共生細菌の分子育種により、海洋細菌由来の新規な有用物質産生宿主を開発することで、病原菌からのサンゴ保護に資する世界初の抗菌薬開発プラットフォームを構築することを目指した。

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)。我々は 2018 年に、一部の *Ruegeria* 属細菌がサンゴ病原菌である *Vibrio coralliilyticus* に対する抗菌物質を生産し、サンゴを保護する可能性を初めて示唆した (Miura and Motone et al.)。さらに、取得した 4 株の *Ruegeria* 属細菌について全ゲノム解析を実施し、抗菌物質の候補遺伝子を取得するとともに、*Ruegeria* 属細菌を宿主とした異種発現系の構築も進めてきた。我々はさらに、2019 年に沖縄のサンゴからも *V. coralliilyticus* に対して抗菌活性を持つサンゴ共生細菌を、*Ruegeria* 属細菌を含む複数種の細菌について 10 株以上取得し(表 1)、国内のサンゴ礁においても同様の活性を持つ細菌が存在し、サンゴを保護する可能性を見出している。本研究では以前から我々が保有・解析してきた *Ruegeria* 属細菌に加えて、新規な種を含む有用物質産生菌を宿主化・実用化することを目指す。申請者らが保有する国産のサンゴ共生細菌カクテルやそれに由来する生理活性物質はサンゴ保護や抗菌薬開発に向けて我が国発の有用な資源となると期待できる。

表 1 沖縄のサンゴ（採捕許可取得済）から取得したサンゴ共生細菌の概要と *Vibrio* 属細菌に対する生育阻止活性

Annotated species	Total No. isolated	No. of isolates showing antibiotic activity against <i>Vibrio</i> sp.
<i>Vibrio</i> sp.	11	0
<i>Ruegeria</i> sp.	29	11
<i>Herbaspirillum</i> sp.	2	1
<i>Shimia</i> sp.	1	1
Others	17	0

【方法と結果】

表 1 に示したサンゴ共生細菌群のうち、代表的なサンゴ病原菌とされる *V. coralliilyticus* やその他の病原菌を含む *Vibrio* 属細菌に対して生育阻止活性を示す *Ruegeria* 属細菌と、サンゴに共生する褐虫藻に共生し、カロテノイドを生産して褐虫藻を高温・酸化ストレスから保護する *Muricauda* 属細菌 (Motone et al. 2020) の 2 種について、それぞれ実用化に向けた検討を行った。

1. *Muricauda* 属細菌のカロテノイド生産能に関する解析

沖縄のアザミサンゴおよび海水から取得した *Muricauda* 属細菌 2 株（発表論文 1）について全ゲノムのドラフト解析を行い、それぞれについてカロテノイド生合成遺伝子群を推定した (図 1)。また、菌体

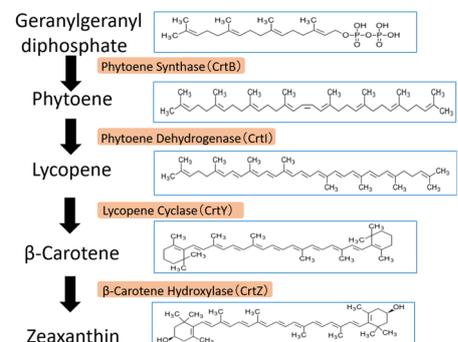


図 1. 推定したカロテノイド生合成経路.

からのカロテノイド抽出法について最適な条件を決定し、HPLCによる分析手法を検討した。

2. 沖縄のサンゴから取得した *Ruegeria* 属細菌の機能解析

以前に取得した *Ruegeria* 属細菌と比較して、沖縄のサンゴから取得した *Ruegeria* 属細菌の特性について評価した。その結果、以前に取得した株では、培養方法によらず *Vibrio* 属細菌に対する生育阻止活性物質の生産がみられたが、今回取得した沖縄産の *Ruegeria* 属細菌では、*Vibrio* 属細菌が共在している場合に限り、生育阻止活性物質を生産することが明らかとなった。また、今回取得した株を全ゲノム解析にかけたところ、以前に取得した *Ruegeria* 属細菌と共通する遺伝子クラスターに加え、新たに抗菌物質をコードしていることが予測されるクラスターを複数見出した。これらの遺伝子クラスターは生育阻止活性を持たない *Ruegeria* 属細菌には見られないものであり、現在遺伝子産物の活性確認を試みている。

3. サンゴに対するプロバイオティクス効果の検証に関する検討

Muricauda 属細菌を褐虫藻に添加する手法については、以前の論文 (Motone et al. 2020) で既に検討しており、現在この褐虫藻をサンゴに共在させる手法について検討中である。また、*Ruegeria* 属細菌については、共同研究により、人工的に飼育したサンゴを無菌化処理したのち *Ruegeria* 属細菌を感染させる手法について、初期検討を行った。

【まとめと今後の展望】

本研究では抗菌薬開発およびカロテノイド生産プラットフォームとして利用可能な *Ruegeria* 属細菌・*Muricauda* 属細菌の実用化に向けて、それぞれ *de novo* ゲノム解析を含む機能解析を行うとともに、サンゴのプロバイオティクスとして各菌を用いるための初期検討を行った。これまでの研究で、こうしたサンゴ共在細菌宿主に対してエレクトロポレーションによる市販プラスミドの形質転換が可能であることを示している。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* 属細菌および *Muricauda* 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や有用カロテノイド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、2020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***, Ito M, Takagi T, Yamashiro H, Nishikawa Y, Nishimura Y, Kobayashi K, Kataoka M. Specific detection of coral-associated *Ruegeria*, a potential probiotic bacterium, in corals and subtropical seawater. *Marine Biotechnology*, 2021;23(4):576–589. doi: 10.1007/s10126-021-10047-2. *Corresponding author, 令和3年度マリンバイオテクノロジー論文賞受賞

【学会発表】

1. 北村 瑠璃子, ○**三浦 夏子**, 伊藤通浩, 高木俊幸, 山城秀之, 西川有美, 西村優菜, 小林慶太, 片岡道彦. Specific Detection of Coral-Associated *Ruegeria*, a Potential Probiotic Bacterium, in Corals and Subtropical Seawater. 第22回マリンバイオテクノロジー学会大会 論文賞受賞講演, online 2022年5月28日
2. 中島玲, 西川有美, **三浦夏子**, 植田充美, 片岡道彦. 分離共培養容器を用いたサンゴ共在細菌間相互作用の実験的再構築. 第22回マリンバイオテクノロジー学会大会, online 2022年5月29日
3. 遠藤芙奈, 西川有美, 高木俊幸, **三浦夏子**, 片岡道彦. 沖縄県のサンゴと海水から単離された *Muricauda* 属細菌 ORYM1, ORYM2 株の機能探索. 第22回マリンバイオテクノロジー学会大会, online 2022年5月29日