

令和 2 年 7 月 9 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15402

研究課題名（和文）陸域からサンゴ礁へ流入する微生物群の実態解明 - サンゴへの感染性と有害性の検証 -

研究課題名（英文）Origins and distribution of coral-associated microorganisms in the environment: imported from land area?

研究代表者

伊藤 通浩 (Ito, Michihiro)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・助教

研究者番号：80711473

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、サンゴと相互作用する微生物群の由来と分布を、特に陸域由来の微生物群のサンゴ微生物叢とサンゴへの病気への影響に着目して解明することを目的として実施した。河口3か所と下水処理場の放流口を有する沖縄県本部町の沿岸域を調査海域として、海水中および陸域の影響が大きい河口の微生物叢と、同海域のエダコモンサンゴの微生物叢を比較した。その結果、陸域とサンゴの両方で生育する微生物の存在が示唆されたが、陸域起源微生物と病気との関連は明らかとならなかった。一方で、海藻に、サンゴと相互作用することが知られている微生物種が見出され、サンゴ微生物叢構成種がサンゴ礁の他生物に生息可能であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サンゴにはサンゴの健康維持に寄与する微生物や、サンゴの病気を引き起こす微生物が存在する。サンゴの病原菌の由来と分布の解明はサンゴ礁保全の一助となる。そこで本研究では、陸域起源の微生物がサンゴに害を与え得るとの仮説の検証を試みた。この検証の結果は判然としていないが、サンゴ礁に隣接する畑土壌より、サンゴの生育の阻害効果を有し、沖縄県で多用されている除草剤の分解微生物を見出すことができた。このような微生物の取得・機能解明と有効活用はサンゴ礁の保全に役立つ可能性がある。また、サンゴ病原菌と、その生育を抑える能力を有する可能性のある菌の、サンゴ礁内での棲み場所について新たな知見を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined the origins and distribution of microorganisms associated with corals in the environment, especially focusing on the potential effect of terrestrial microorganisms on coral microbiome and coral diseases. The microbiome of a reef building coral *Montipora digitata* inhabiting Nagazone reef, was analyzed and compared to those of sea water along the coastal area of Motobu town, Okinawa, which has three river mouths and a sewage treatment plant. The result was consistent with the hypothesis that a bacterial lineage inhabit both terrestrial and coral reef environment. The involvement of bacteria with coral disease was not clear. Furthermore, we found bacteria potentially associated with corals in a brown alga *Cladosiphon okamuranus* inhabiting the coastal area in Bise, Motobu town. This result suggests that coral-associated bacteria are distributed in taxonomically-different host species.

研究分野：微生物生態学

キーワード：サンゴ サンゴ微生物叢 陸域起源微生物 海藻共存微生物 除草剤 除草剤分解微生物

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

サンゴ礁は世界的に衰退の一途を辿っている。世界のサンゴ礁の 20%が既に失われ、24%が現時点で崩壊の危機に瀕し、26%が長期的に崩壊の危険があると推定されている (Wilkinson (ed), 2004)。気候変動に伴う海水温上昇などのグローバルな要因とともに、沿岸や流域の開発、およびそれらに起因する陸域からの土壌、栄養塩、および農薬等の合成有機化合物の流入などのローカルな要因が複合的にサンゴ礁を脅かしている (Burke et al. 2011)。

1990 年代以降、サンゴの病気に関する報告が急増している。カリブ海の代表的な枝状サンゴであった *Acropora palmata* は、White Pox 病によりその約 90%が死滅し、絶滅危惧種となった。本病の病原菌は、人畜の糞便に含まれ、ときに高齢者の院内感染で問題となる *Serratia marcescens* と同定された (Patterson et al. 2002)。また、同じくカリブ海において、八放サンゴの 1 種 *Gorgonia ventalina* の大量死が発生した (Smith et al. 1996)。この原因菌は土壌真菌の 1 種 *Aspergillus sydowii* であった (Geiser et al. 1998)。これらの事例は、陸域を起原とする微生物群がサンゴ礁海域に流入し、サンゴに感染して病気を引き起こす可能性を示唆している。一方で、サンゴ礁に実際に流入する陸域起源微生物群のサンゴへの感染性および病原性は検証されておらず、陸域に生息する微生物群の機能解析もされていない。

また、サンゴと相互作用する微生物群は、サンゴ礁内においても、サンゴ以外の生物体や、その他の環境に生息している可能性がある。しかしながら、サンゴに病原性を示す微生物分類群のサンゴ礁域における分布については、サンゴの病変部からの検出例を除いては未知の状態である。

### 2. 研究の目的

以上を踏まえ、本研究では、(1) 陸域由来微生物群のサンゴ礁域への流入とそのサンゴへの影響、(2) サンゴと相互作用すると想定される微生物群のサンゴ礁内での分布、および(3) サンゴ礁に隣接した陸域に生息する微生物群の特性、の 3 点について知見を得ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 調査地点

沖縄県本部町の沿岸域を調査フィールドとした。沖縄島、瀬底島および離礁群に囲まれた遮蔽的な海域に位置する「ナガゾネ」を、サンゴを採取する主要地点とした。本離礁は付近に 3 つの河川 (港川、満名川、大小堀川) と下水処理場の放流水の流入があり、陸域の影響に常時曝されている。解析対象のサンゴは、ナガゾネに豊富に生息し、調査期間中に同海域にて枝が白くなる病徴を呈したエダコモンサンゴ (*Montipora digitata*) とした。本地点に加え、満名川河口域、大小堀川河口域および下水処理場の放水口付近を定点として、海水試料を採取した。

海藻試料の採取は同町備瀬の地先にて行った。解析対象の海藻には同海域に自生するオキナワモズク (*Cladosiphon okamuranus*) を選定した。

サンゴ礁に隣接する陸域からの土壌採取は本部町瀬底島のサトウキビ畑にて行った。

#### (2) 微生物叢解析法

各地点にて採取したサンゴ試料は、採取後ただちに RNAlater (Invitrogen) に浸漬し、採取当日のうちに - 80 °C にて保存した。海水試料は孔径 0.2 μm のメンブレンフィルターにてろ過し、フィルター上に微生物群を捕集した。これを RNAlater に浸漬し、採取当日のうちに - 80 °C にて保存した。

これら試料からの DNA 抽出には DNeasy plant mini kit (Qiagen) を用いた。オキナワモズクからの DNA 抽出にあたっては、後述するように、キットの標準プロトコルを改変して DNA 抽出効率を向上させた。

抽出した DNA を PCR 反応の鋳型に使い、サンゴと海水については 16S rRNA V5-V6 領域を標的として、オキナワモズクについては同領域に加えて V3-V4 領域を標的として、16S rRNA 部分配列を PCR 増幅した。この増幅産物を MiSeq シーケンサーにて解析した。

MiSeq シーケンサーの産出するデータ解析にあたっては、vsearch を用いてクオリティコントロールと OTU 分けを行った。各 OTU の代表配列の分類群推定は、RDP classifier および Blastn を用いた。

#### (3) 土壌より分離した除草剤分解細菌の機能解析

サンゴ礁に隣接した畑土壌より分離した除草剤ジウロン (DCMU; 3-(3,4-ジクロロフェニル)-1,1-ジメチル尿素) 分解微生物によるジウロン分解能評価は、ジウロンを含む無機液体培地に分離菌株を接種し、フォトダイオードアレイ検出器付き HPLC を用いて培地中に残存する除草剤を定量分析することにより行った。

### 4. 研究成果

#### (1) サンゴ微生物叢と陸域由来の微生物叢の関係

ナガゾネより採取したエダコモンサンゴの微生物叢では、既知の i) *Endozoicomonas* 属細菌、ii) *Geobacter* 属細菌、および iii) *Neisseria* 属細菌に、それぞれ 96-98%、96%、100% identity

を示す OTU が優占していた。*Endozoicomonas* 属細菌はサンゴやカイメン等の他の海産無脊椎動物に高頻度に検出される細菌群であり、サンゴと共生関係にあって、サンゴに有益な効果をもたらす菌群であると想定されている。*Geobacter* 属細菌は鉄還元菌のグループを含む絶対嫌気性菌である。*Neisseria* 属細菌はヒトを含む動物の粘膜常在菌として知られている。これらに帰属された OTU がエダコモンサンゴ由来の優占種であった。*Geobacter* 属細菌や *Neisseria* 属細菌がサンゴ微生物叢内で優占していた報告は例がなく、興味深い。

次いで、複数の OTU が *Sphingomonas* 属細菌種と 99-100% の高い identity を示した。*Sphingomonas* 属細菌群は土壌や植物体等の陸域で高頻度に検出される菌群である。実際、エダコモンサンゴに見出された *Sphingomonas* 属細菌に近縁な OTU の blast 解析におけるトップヒットは、植物由来の *Sphingomonas* 属細菌株や土壌由来の *Sphingomonas* 属細菌株であった。以上の結果は、エダコモンサンゴに検出された *Sphingomonas* 属細菌群が、陸域にも生息する微生物集団である可能性を示唆する。このことの検証には、本研究において実施した 16S rRNA 部分配列の比較解析に加え、ナノポアシーケンサーなどロングリードのシーケンサーを用いた 16S rRNA 遺伝子の全長を用いた比較や、他のマーカー遺伝子を組み合わせた比較、またはゲノム配列の比較解析が有効であると考えられる。

*Sphingomonas* 属細菌はかつてサンゴ白斑病の原因菌と示唆されたことがある (Richardson et al. 1998)。本研究で調査地域としたナガゾネのエダコモンサンゴ群落では、実際に、枝が白くなる病徴が観察された (図 1)。この病徴と、*Sphingomonas* 属細菌および他のサンゴ微生物叢構成種の関係の解明は今後の課題である。



図 1 白く変色する病徴を呈したナガゾネのエダコモンサンゴ (2017 年 5 月)

## (2) サンゴ微生物叢と海藻に共存する微生物叢と関係

サンゴ礁域におけるサンゴと相互作用する微生物群の分布について、サンゴ礁域の他の生物にサンゴ微生物叢構成種が共存する可能性を踏まえ、本部町沿岸域に自生する褐藻オキナワモズク (図 2) の共存微生物群の解析を行った。オキナワモズクの微生物叢は解析例がなく、微生物叢解析に適した DNA 抽出法が不明であったため、まず DNA 抽出法の最適化を行った。

植物用 DNA 抽出キット (DNeasy plant mini kit) の標準プロトコルに従ったところ、DNA 抽出効率が微生物叢解析には不十分であった。そこで、キット標準プロトコルに、ビーズビートイングと有機溶媒抽出のステップを追加したところ、DNA 抽出効率が標準プロトコルの 4 倍にまで向上し、微生物叢解析が実行可能となった。

本部町沿岸海域で採取した天然オキナワモズクの微生物叢では、Proteobacteria 門に属する細菌群と、Verrucomicrobia 門に属する細菌が優占していることが明らかとなった。この中で、非優占種ながら、サンゴの病原菌として知られる *Vibrio coralliilyticus* に約 98% の identity を示す OTU を見出した。さらに、微生物叢解析に供したオキナワモズクより、*Vibrio coralliilyticus* に 16S rRNA 遺伝子が 100% 一致した微生物株を分離した。また、*Vibrio* 属細菌の拮抗菌として知られる *Ruegeria* 属細菌種 (Miura et al. 2019) を微生物叢データの中に見出した。

本部町沿岸海域では、オキナワモズクはエダコモンサンゴとともに礁池内に自生する。サンゴに病気を引き起こす微生物と、その病原微生物に拮抗作用を示す微生物がオキナワモズクに同所的に生息していること可能性が示唆されたことは興味深い。サンゴの病原微生物や、サンゴの健康に寄与する微生物は、少なくとも一時的に、サンゴと同所的に生息する他の生物を宿主とする可能性がある。サンゴと相互作用する微生物の由来、分布およびサンゴへの感染経路を検討する上で、サンゴと同所的に生息する他の動植物の微生物叢の解析が有効であると考えられる。



図 2 エダコモンサンゴと同所的に生息するオキナワモズク

## (3) サンゴ礁に隣接した土壌に生息する微生物の特性解析

本部町沿岸域には多くのサトウキビ畑が存在する。降雨の際などに、これらサトウキビ畑の土壌が海域へ流出することが考えられる。沖縄県のサトウキビ畑には、サンゴの生育を阻害することが実験的に明らかとなっている除草剤ジウロン (DCMU; 3-(3,4-ジクロロフェニル)-1,1-ジメチル尿素) (Watanabe et al. 2006) が多用されている。ジウロンが使用された土壌およびその微生物群の流出が実際のサンゴ礁に与える影響は不明である。一方で、ジウロンを分解する微生物

はこれまでに報告がある (Sørensen et al. 2013; Villaverde et al. 2017) ことから、ジウロンが使用されたサトウキビ畑土壌において、ジウロンが分解される可能性があると考えられた。そこで、サンゴ礁に隣接したサトウキビ畑土壌の微生物群を、特にジウロンを分解する微生物の存在の有無に着目して解析した。

本都町瀬底島の、ジウロンが使用されているサトウキビ畑土壌を無機液体培地に接種した。この土壌懸濁液において、ジウロンの減少が観察された。そこで、この土壌懸濁液から、ジウロンを分解する微生物の分離を試みた。ジウロンを単一炭素源として含む無機液体培地に土壌懸濁液を接種して培養し、この操作を繰り返すことで、ジウロン分解細菌の集積培養を行った。以上を経て、瀬底島のサトウキビ畑土壌より、ジウロンの分解能を有する細菌株の分離に至った。

本細菌株を  $10^3$  cells mL<sup>-1</sup> となるように無機液体培地に接種すると、10 ppm の濃度のジウロンを検出限界値以下まで分解した。一方で、100 ppm の濃度のジウロンに対しては分解が途中で停止した (図 3)。この原因は分解代謝の過程で毒性の強い代謝産物が生じていることであると考えられた。

本細菌株の 16S rRNA 遺伝子の解析から、本株は Actinobacteria 門 *Pseudonocardia* 属に属する細菌であると同定された。ジウロンを代謝する微生物の報告は数例あるが、ジウロン分解代謝能を有する *Pseudonocardia* 属および Actinobacteria 門に属する細菌株は初めての例である。

本株は、ジウロンを少なくとも 2 段階分解代謝することが判明した。

以上より、沖縄県では、サンゴの生育を阻害する除草剤がサンゴ礁に隣接したサトウキビ畑に散布されているものの、この除草剤を分解する微生物が畑土壌に分布していることが明らかとなった。このような土壌は降雨に伴い海域に流出することがあると考えられるが、散布された除草剤の少なくとも一部は除草剤分解微生物により分解されている可能性がある。また、これらの細菌群も同時に海域へ流出すると考えられる。実際に、サトウキビ畑よりジウロンが海域にどの程度流出しているのか、また同時に流出するジウロン分解細菌が海域において生残しその機能を発揮するのか否かは今後の課題である。

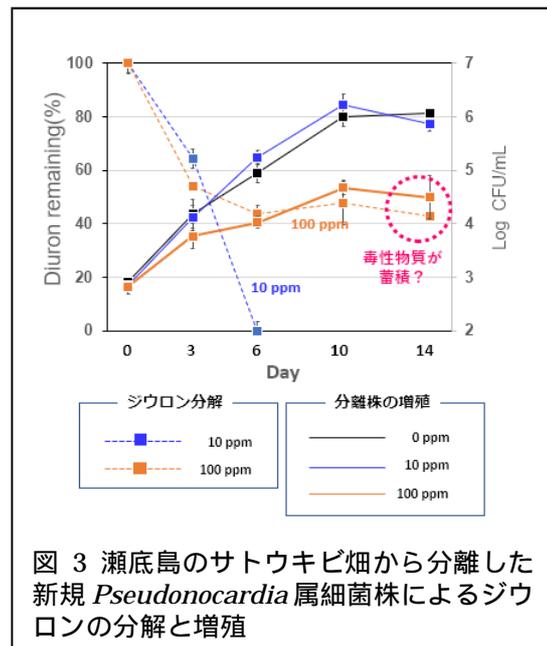


図 3 瀬底島のサトウキビ畑から分離した新規 *Pseudonocardia* 属細菌株によるジウロンの分解と増殖

#### < 引用文献 >

- Wilkinson (ed), Status of Coral Reefs of the World. Global Coral Reef Monitoring Network, 2004.
- Burke et al., Reefs at Risk Revisited. World Resources Institute, 2011.
- Patterson et al., The etiology of white pox, a lethal disease of the Caribbean elkhorn coral, *Acropora palmata*. Proc Natl Acad Sci USA 2002, 99, 8725-8730.
- Smith et al., Caribbean sea-fan mortalities. Nature 1996, 383, 487.
- Geiser et al., Cause of sea-fan death in the West Indies. Nature 1998, 394, 137-138.
- Richardson et al., Florida's mystery coral-killer identified. Nature 1998, 392, 557-558.
- Miura et al., *Ruegeria* sp. strains isolated from the reef-building coral *Galaxea fascicularis* inhibit growth if the temperature-dependent pathogen *Vibrio coralliilyticus*. Mar Biotechnol 2018, 21, 1-8.
- Watanabe et al. Toxicological effects of biocides on symbiotic and aposymbiotic juveniles of the hermatypic coral *Acropora tenuis*. J Exp Mar Biol Ecol 2006, 339, 177-188.
- Sørensen et al., Degradation and mineralization of diuron by *Sphingomonas* sp. SRS2 and its potential for remediating at a realistic mg L<sup>-1</sup> diuron concentration, Pest Manag Sci 2013, 69, 1239-1244.
- Villaverde et al., Bioremediation of diuron contaminated soils by a novel degrading microbial consortium. J Environ Manage 2017, 188, 379-386.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤通浩
2. 発表標題 サンゴの中の微生物
3. 学会等名 日本微生物生態学会第32回大会 市民公開シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宇江城蘭, 伊藤通浩, 新里尚也, 田中厚子
2. 発表標題 オキナワモズク共存細菌叢解析法の構築
3. 学会等名 日本サンゴ礁学会第21回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宇江城蘭, 田中厚子, 新里尚也, 伊藤通浩
2. 発表標題 オキナワモズク共存細菌群の網羅的解析法の構築
3. 学会等名 日本微生物生態学会第33回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 與那覇志人, 會田祥平, 佐藤龍之介, 永山敦士, 伊藤通浩, 新里尚也
2. 発表標題 サンゴの生育を阻害する除草剤ジウロンの分解微生物の分離と解析
3. 学会等名 日本微生物生態学会第33回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤龍之介、與那覇志人、會田祥平、永山敦士、伊藤通浩、新里尚也
2. 発表標題 沖縄県で多用される除草剤の分解微生物の分離と特性解析
3. 学会等名 2019年度日本農芸化学会西日本・中四国合同支部会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----