

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 7 月 31 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580286

研究課題名(和文) 海洋無脊椎動物を用いた有用難培養微生物のバイオエンリッチメント

研究課題名(英文) Bioenrichment of useful but uncultivable microorganisms using marine invertebrates

研究代表者

張 成年 (CHO, NARITOSHI)

独立行政法人水産総合研究センター・中央水産研究所・グループ長

研究者番号：70360766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000 円、(間接経費) 1,230,000 円

研究成果の概要(和文)：海産無脊椎動物腸を培養装置としたアルギン酸分解微生物群およびアルギン酸リアーゼ遺伝子群のバイオエンリッチメントの妥当性を検証するため、単一種の褐藻(カジメ)をサザエおよびタツナミガイに一ヶ月間給餌し、腸内細菌叢の菌種組成変化とアルギン酸リアーゼ活性を評価した。細菌叢は一定方向に収束する傾向を示し、特にサザエで顕著であった。アルギン酸リアーゼ遺伝子種も多くみられ、アルギン酸リアーゼ酵素活性も上昇する傾向を示したことから、与えたカジメの消化に適した菌種組成または酵素遺伝子種を有する細菌叢に変遷した可能性が高い。バイオエンリッチメントは高活性な新規アルギン酸リアーゼ遺伝子を取得する方法と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Although a key issue is to find enzymes and/or marine microorganisms which efficiently degrade seaweed, many bacteria are difficult to culture. We attempted enrichment of gut microflora of marine invertebrates by controlling food supply. A brown macro alga (*Ecklonia cava*) was fed to sea snail (*Turbo cornutus*) and sea hare (*Dolabella auricularia*) for a month. Using DNA extracted from gut, 16S rDNA was amplified by PCR and cloned. Nucleotide sequences of a total of 96 clones per individual were determined. In the sea snail, *Vibrio* spp. drastically decreased and *Psychrilyobacter* spp. progressively increased, suggesting *Psychrilyobacter* spp. may have enzymes for efficiently degrading the macro alga. We also observed many alginate lyase genes and the increased enzyme activity as well. Thus, the bacterial flora can be modified through consecutive feeding of specific seaweed, and enriched gut microflora can be a rich source of the highly efficient enzymes for total seaweed degradation.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：難培養微生物 海産無脊椎動物 腸内細菌叢 バイオエンリッチメント アルギン酸リアーゼ メタゲノム

## 1. 研究開始当初の背景

近年、エネルギー問題と低炭素社会の実現に向けて、カーボンニュートラルなバイオエネルギーが注目され、その開発に注力されている。現在、稲わら・麦わらの草本バイオマス、廃材の木質バイオマスなど食料と競合しないセルロース系バイオマスを原料として研究が進められている。一方、農業国でない我が国では、稲わら・麦わら原料の安定供給が疑問視されており、廃材や廃パルプ使用に関しても、エネルギー需要の高まりによる森林伐採が懸念されている。海外からの原料輸入は、輸送エネルギーを費やす時点でエネルギー収支が成り立たず、国内でバイオマスを完全自給できる体制をとるためには、海洋バイオマスの有効利用が必要である。繁殖力の強いホンダワラやアカモク等を日本の領海と排他的経済水域をあわせた海域約447万平方キロメートルのうち1~2%使用して養殖するだけで、年間400万キロリットルのバイオエタノールが生産できるバイオマスを確保できるものと試算されている(水産振興会構想発表)。バイオエタノール生産には、酵母のエタノール発酵が利用されているが、草本・木質バイオマスのうち、酵母が資化できないセルロース系バイオマスの含有率は50%を占める。それ故、セルラーゼを組み換えた酵母の作出や、前処理段階での糖化プロセスがキーとなっている。一方、海洋バイオマスを糖化する際に問題になるのは塩濃度と陸上より複雑な糖成分構成であり、このような環境下では陸上バイオマス糖化に使用されている酵素群は阻害される。よって、海洋由来のバイオマス変換酵素の取得が必須要件となる。木質バイオマスからのバイオエタノール生産において、セルラーゼがキーになることから、米国ではシロアリ腸内細菌メタゲノムからセルラーゼを分離している。セルロースは結晶性セルロースと非結晶性セルロースからなり、分解が容易な非結晶性セルロースを最初に分解するendo-1,4-β-glucanase、結晶性セルロースを分解するcellulose 1,4-β-cellobiosidase (exo-cellobiohydrolase)、β-グルコシド結合を切断して単糖にするβ-glucosidaseが必要である。現在、セルロース系バイオマスをバイオエタノールに変換する際、非結晶性セルロースの糖化が課題となっており、CBH (cellobiohydrolase)の高活性化、耐熱化、耐酸性化等の高機能化が求められている。未知微生物の未知なる酵素に期待が寄せられている。そこで様々な構成糖の木材をシロアリに食べさせ、摂食した木材に適した腸内細菌のフローラに誘導してから、腸内細菌メタゲノムを回収するという試みが既に行われている。大型藻類は3つの植物門に分類され、下記のように構成糖が大きく異なる。

- 1) 紅藻(セルロース、ヘミセルロース、β-1,3-キシラン、β-1,4-マンナン、ポルフィラン、寒天、カラギーナン、紅藻デンプン)
- 2) 褐藻(セルロース、ヘミセルロース、アルギン酸、フコイダン、サルガッサン、ラミナラン)
- 3) 緑藻(セルロース、β-1,3-キシラン、β-1,4-マンナン、グルクロノキシロラムナン硫酸、キシロアラビノガラクトン硫酸、グルクロノキシロラムノガラクトン硫酸、アミロース、アミロペクチン)

すなわちこれらの多糖と構成単糖の変換酵素が必要となる。褐藻に含まれるポリフェノール化合物を始めとする阻害物の夾雑、高塩分や類似糖の共存といった環境下でも活性を示す頑強な酵素が望まれる。藻食性無脊椎動物の腸内細菌は、このような阻害的環境の中で難分解性の多糖類を資化している。国内では、アメフラシの絞り汁からアルギン酸リアーゼを分離した報告がある。現状ではこれらの微生物を培養することは不可能だが、メタゲノムとして遺伝子を分離することは可能である。申請者は、すべての酵素を網羅的に取得することを目指しており、戦略的試料採取が必要となる。そこで構成糖が大きく異なる藻類を藻食性海洋無脊椎動物に与えて飼育し、各藻類の分解に適した腸内フローラに誘導した後メタゲノムスクリーニングを行うことによって効率的に有用細菌の検出が可能となる。

## 2. 研究の目的

海藻類を摂食する海産無脊椎動物の腸内細菌は、藻類含有の多糖類を高効率に分解する消化酵素を合成していると考えられる。しかしながら、培養できる細菌種はごくわずかであり、さらなる研究推進の大きな障壁になっている。そこで本研究では、無脊椎動物の腸をインキュベーション・ポットとしてターゲット酵素を保有する細菌叢をエンリッチすること、エンリッチ後の腸内から回収した細菌メタゲノムを用いて海洋バイオマス変換酵素をスクリーニングすること、を目的とする。広大な海洋面積を持つ我が国のバイオエネルギー供給源が海洋バイオマスに移行することを想定して、早々に着手することが必要な課題であると考えられる。

## 3. 研究の方法

### サンプル試料の調整

海産無脊椎動物にはサザエ(sea snail)およびタツナミガイ(sea hare)を用いた。これらの餌として褐藻のカジメを用い、水槽内で4週間給餌飼育した。そして、カジメを給餌する前の野生個体と給餌後の給餌個体を解剖し、腸を摘出した。サザエは腸が分節化されているため、大腸と小腸を区別し、それぞれの海産無脊椎動物の腸内容物からバクテリアのDNAを抽出した。

## バクテリアの多様性

抽出した DNA を鋳型として 16S rRNA 遺伝子を PCR 増幅し、次世代シーケンサーの GS Junior を用いて増幅産物のシーケンシングを行った。得られた塩基配列は 16S analysis pipeline (Kim et al. 2013) を用いてフィルタリングした。フィルターを通過した塩基配列群を 96% identity で Operational taxonomic units (OTU) に分割することで、腸内に存在するバクテリアの種数とその割合を算出した。また、各 OTU の代表配列を BLAST 検索し、各 OTU の属する分類群を推定した。これらの結果をもとに、腸内におけるバクテリアの構成を調べた。また、同時に主座標分析を行うことで、個体ごとのバクテリア叢を比較した。

## アルギン酸リアーゼの多様性

アルギン酸リアーゼの属する最も大きなファミリーの一つである PL7 ファミリーの酵素群の既知配列を、データベースより抽出し、アライメントを作製することで二つの保存性の高い領域を見出した。これらの領域の保存配列をもとに PL7 ファミリーアルギン酸リアーゼ遺伝子部分配列を増幅可能な縮重プライマーを設計した。

次に、設計した縮重プライマーを用いて、前述の DNA を鋳型として PL7 ファミリーアルギン酸リアーゼ遺伝子を PCR 増幅した。増幅産物のうち、目的のサイズの画分を汎用ベクターにクローニングした。その後、一つの腸サンプルにつき、48 クローンをサンガー法によりシーケンシングした。得られた塩基配列はアミノ酸配列に翻訳し、系統解析を行った。また、アルギン酸リアーゼ部分配列の多様性をもとに、主座標分析を行った。

## アルギン酸リアーゼ活性

天然個体および給餌飼育個体の腸内容物をリン酸緩衝生理食塩水でよく洗浄し、腸内に含まれる遊離の宿主生物由来アルギン酸リアーゼを除去した。その後、腸内容物からバクテリア分画を調製した。アルギン酸リアーゼの活性は、還元糖の定量である Somogyi-Nelson法に準じて行った。

## 4. 研究成果

### バクテリアの多様性

主座標分析では、類似した細菌叢ほど近接し、異なる細菌叢ほど互いに離れたプロットとして表される。16S rRNA 遺伝子に基づく主座標分析の結果 (Fig. 1)、1) サザエとタツナミガイの腸内細菌叢は互いに大きく異なる、2) サザエの大腸細菌叢は、給餌試験によって有意に個体差が減少する ( $p < 0.001$ )、3) サザエの小腸細菌叢およびタツナミガイの腸内細菌叢は、有意差は検出されなかったものの、給餌試験によって個体差が減少する傾向が

見られる、の 1)-3)の結果を得た。属レベルでの腸内細菌叢における優先種の構成を調べた結果、サザエは大腸と小腸のいずれの細菌叢においても、給餌試験によって、*Psychrilyobacter* 属は増加したが、*Mycoplasma* 属は減少し、*Vibrio* 属は割合が変わらなかった。一方、タツナミガイは給餌試験によって、*Psychrilyobacter* 属、*Vibrio* 属および *Bacillus* 属は増加し、*Mycoplasma* 属および *Propionigenium* 属は割合が減少した。

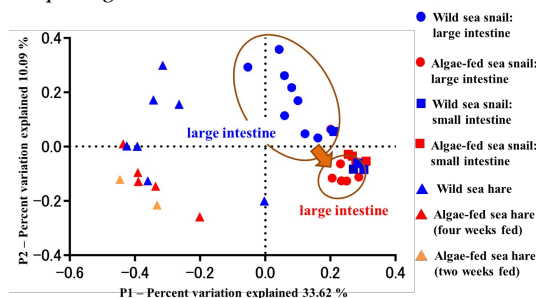


Fig. 1 Principal coordinate analysis based on 16S rRNA genes using the unweighted UniFrac metric.

### アルギン酸リアーゼの多様性

アルギン酸リアーゼの多様性に基づく主座標分析の結果は、16S rRNA 遺伝子に基づいた主座標分析と類似していた (Fig. 2)。すなわち 1) サザエとタツナミガイの腸内アルギン酸リアーゼ相は互いに大きく異なっていた。2) サザエの大腸アルギン酸リアーゼ相は、給餌試験によって有意に個体差が減少した ( $p < 0.001$ )。3) サザエの小腸アルギン酸リアーゼ相およびタツナミガイの腸内アルギン酸リアーゼ相は、給餌試験によって個体差が減少する傾向が確認された。検出されたアルギン酸リアーゼと既知アルギン酸リアーゼ配列を含めた系統樹は、本研究において検出した配列群が広い範囲にわたっていることを示した。また、既知アルギン酸リアーゼと系統的に離れて位置する新規のアルギン酸リアーゼ遺伝子候補配列も多く見出された。また、検出されたアルギン酸リアーゼの BLAST 検索において、ほとんどは 42.3-99.4% の identity で *Vibrio* 属細菌株の有するアルギン酸リアーゼ遺伝子とヒットした。

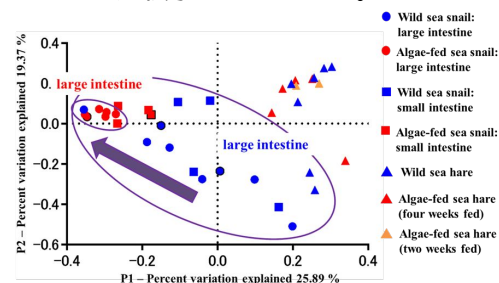


Fig. 2 Principal coordinate analysis based on PL7 family alginate lyase amino acid sequences using the weighted UniFrac metric.

## アルギン酸リアーゼ活性

サザエとタツナミガイの腸内細菌叢におけるアルギン酸リアーゼの比活性 (unit/mg) を測定した結果、サザエの小腸細菌叢由来アルギン酸リアーゼは、給餌試験後に活性が有意に向上した (Fig. 3A) ( $p < 0.05$ )。また、サザエの大腸由来アルギン酸リアーゼは給餌試験を通して活性が低く、小腸の方がはるかに高い活性を示した。タツナミガイの腸内細菌叢由来アルギン酸リアーゼは、給餌後に活性は高まる傾向は見られたが、サザエの小腸由来アルギン酸リアーゼに比べると、活性は有意に低かった (Fig. 3B) ( $p < 0.0001$ )。

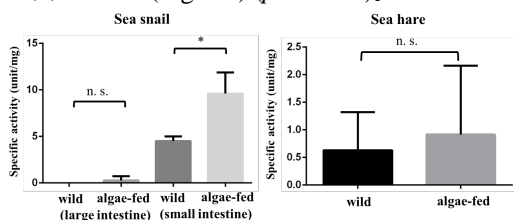


Fig. 3 Activity assay for alginate lyase.

### 【結言】

サザエおよびタツナミガイの腸部位における細菌叢の菌種組成およびアルギン酸リアーゼ組成の違い、ならびに、餌料に対する応答性の違いが明らかになった。本結果は、腸部位細菌叢がカジメに適応したことを示唆すると考えられる。また、本結果は、サザエおよびタツナミガイにおける腸内細菌との共生関係を解明する上でも重要な知見であると考えられる。

また、これら海産無脊椎動物の腸内には、新規のアルギン酸リアーゼ遺伝子が多く存在する可能性が高い。加えて、単一種の海藻を給餌することで、海産無脊椎動物の腸内細菌叢は一定方向に収束する傾向を示し、酵素活性も上昇する傾向を示したことから、本研究で示した“バイオエンリッチメント”戦略は、高活性な新規アルギン酸リアーゼ遺伝子を取得する方法として有用性が高いと考えられる。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計8件)

Takahashi, M., Mori, T., Shibata, T., Kuroda, K., Chow, S., Ueda, M., Takeyama, H. (2014): Isolation of an exolytic alginate lyase gene from a novel marine bacterium degrading brown algae. 10th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference (Taipei, Taiwan) 5月5日

高橋真美・モリ テツシ・柴田敏行・黒田浩一・張 成年・植田充美・竹山春子(2014): 褐藻分解細菌からのアルギン酸リアーゼの探索および分解能の評価. 第16回マリンバイオテクノロジー学会大会(津)5月31日

モリ テツシ・高橋真美・柴田敏行・黒田浩一・張 成年・植田充美・竹山春子(2014): Identification of exolytic alginate lyase genes from brown algae degrading marine bacteria. 日本化学会第94春季年会(名古屋)3月28日

伊通 浩・渡邊幸太郎・モリ テツシ・丸山 徹・丹羽健太郎・緑川直子・張 成年・竹山春子(2014): 単一海藻給餌に対するサザエ腸内微生物フローラの適応. 日本農芸化学会(新宿)3月27日

Takahashi, M., Mori, T., Midorikawa, N., Shibata, T., Kuroda, K., Chow, S., Ueda, M., Takeyama, H. (2013): Screening for exolytic alginate lyase genes of bacteria isolated from marine environmental samples. 10<sup>th</sup> International Marine Biotechnology Conference (Brisbane, Australia)11月15日

伊通 浩・渡邊幸太郎・モリ テツシ・丸山 徹・緑川直子・張 成年・竹山春子 (2013): Bioenrichment of bacteria degrading seaweed-derived polysaccharides in the gut of marine invertebrates. 第64回日本生物工学会大会(神戸)10月25日

高橋真美・モリ テツシ・緑川直子・張 成年・竹山春子 (2013): アルギン酸リアーゼ生産菌の単離培養および酵素の解析. 第15回マリンバイオテクノロジー学会大会(那覇)6月1日

渡邊幸太郎・モリ テツシ・緑川直子・張 成年・竹山春子 (2013): 単一海藻種給餌による海産無脊椎動物腸内細菌叢の変化. 第15回マリンバイオテクノロジー学会大会(那覇)6月1日

[図書](計0件)

[産業財産権]  
出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:

番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者  
(張 成年)

研究者番号：70360766

(2)研究分担者  
(丹羽健太郎)

研究者番号：20371875

(竹山春子)

研究者番号：60262234

(3)連携研究者  
(無し)

研究者番号：