

令和元年6月18日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07229

研究課題名(和文) 海洋放線菌インベントリー構築と新種推定株の保全

研究課題名(英文) Construction of inventory for marine actinomycetes and preservation of new species

研究代表者

山村 英樹 (YAMAMURA, Hideki)

山梨大学・大学院総合研究部・准教授

研究者番号：70516939

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、亜熱帯～熱帯地域から数多くの新種の放線菌が発見されており、創薬資源としてもこれら地域の探索基盤を構築することが期待されている。しかし、亜熱帯地域の島嶼では赤土の海洋流出が度々確認され、沿岸海域には陸生と海生の両方が混在していると考えられる。本研究は、赤土の海洋流出モデル系において陸生放線菌の大部分が海水中でも生存することを確認した。さらに赤土が高頻度に流出する海域と少ない(無い)海域から放線菌の分離を行った結果、赤土の流出履歴の多い海域で放線菌数の上昇を確認した。リーフ外のサンプルは赤土の流出の影響をほとんど受けないと考えられ、新種と推定される分離株を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放線菌は土壌など様々な自然環境試料から分離され、抗生物質などの生産菌として重要である。近年は亜熱帯～熱帯の海洋が放線菌の分離源として注目されているが、赤土の流出の影響は考慮されてこなかった。本研究では、赤土が海洋へ流出することで放線菌数および種の多様性が変化することを初めて見出すことができた。得られた分離株の中には新種と推定されたものもあり、一部は寄託することで種の保全を行うことができた。以上の結果は海洋から放線菌を分離する際の指針となりうるものである。また、新種推定株を保存できたことにより、新たな抗生物質などの医薬品を探索するための遺伝資源を確保することができた。

研究成果の概要(英文)：Recently, many new species of actinomycetes have been discovered from subtropical to tropical regions, therefore it is important to construct a basis for isolation of actinomycetes in this area as a drug discovery resource. However, red soil runoff is frequently observed on islands in the subtropics, and it is thought that both terrestrial and marine species are mixed in the coastal. This study confirmed that most of the terrestrial actinomycetes survive in seawater in a model simulated red soil ocean runoff. Furthermore, as a result of isolation of the actinomycetes from the area where red soil flows frequently and the area where there is little (no) flow, the increase of the number of actinomycetes was confirmed in the area where red soil has a large outflow history. The samples in outside the reef were considered to be little affected by red soil runoff, and it was possible to obtain isolates suspected to be new species.

研究分野：応用微生物学

キーワード：放線菌 分類学 新種保全 海洋 土壌流出

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

放線菌は一般的に糸状に生育するグラム陽性細菌であり、抗生物質などの生産菌として重要である。放線菌は土壌や河川、落葉、堆肥など様々な自然環境試料から分離することができる。近年、亜熱帯～熱帯地域から数多くの新種の放線菌が発見されており、創薬資源としてもこれら地域から分離される放線菌の探索基盤を構築することが期待されている。我々は本研究に先立って、日本の亜熱帯域の土壌に生息する放線菌相の解明を目的とし、西表島土壌 94 点から 566 株の放線菌の分離を行った。その結果、西表島には 19 科 59 属 194 種という多様性の存在を解明し、10 種の新種放線菌を提案している。一方で、海でしか分離されない海洋放線菌 *Salinispora* 属が発見され、海洋放線菌が新規な抗生物質の探索源として重要になってきた。これまでに海洋放線菌は海底泥 (Maldonado ら 2005, IJSEM) や海綿 (Khan ら 2010, Actinomycetologica) などから分離されており、主に生物多様性が豊かな亜熱帯地域から分離が行われている。

2. 研究の目的

しかしながら、亜熱帯地域に属する島嶼では農地の開発により赤土の海洋流出が度々確認されており、それを踏まえると海洋のなかでも特に陸地から近い沿岸海洋からは陸生放線菌が分離される可能性が高い。つまり、陸地から近い沿岸海域には陸生と海生の両方が混在していると考えられるが、実際に混在しているという報告はない。そこで、本研究は、まず赤土の海洋流出を想定したモデル系における放線菌数の分布を調査し、実際に赤土が高頻度に流出している沿岸海域と流出の少ない(無い)海域から放線菌の分離を行い、比較することで海洋における赤土流出の影響が放線菌の分布にどう影響するのかを調査した。また、海生の放線菌と考えられる新種の放線菌については分類学的な性状を調査し、遺伝子資源としての保存を行った。

3. 研究の方法

1). 赤土流出モデルにおける陸生放線菌の生存調査

赤土の流出が海洋の放線菌に影響を及ぼす、という仮定の下で赤土に由来する放線菌が海洋環境で生存可能であるかを確認する。具体的には、簡易的な赤土流出モデル系として赤土 3 点を蒸留水もしくは人工海水にそれぞれ 1 週間浸漬させ、その後に放線菌の選択分離培地である Humic acid-Vitamin Agar (HVA) で放線菌のコロニー数を測定した。

2). 赤土、沿岸海域、沖合海域からのサンプリングと放線菌の分離

赤土の流出源とその流出先として沖縄県石垣島の轟川河口流域(白保海域)からサンプリングを行った。流出源として想定される轟川上流のサトウキビ畑から 3 点、轟川河口流域から赤土流出被害の多い海域の底泥 3 点、被害報告の少ない海域の底泥 2 点、やや沖合のリーフ内とリーフ外からそれぞれ 5 点をサンプリングした。リーフ内は流出した赤土が海流によって拡散する可能性がある場所であるものの流出源(轟川河口)から比較的距離が離れている。また、リーフ外は赤土の流出の影響がないとされている。これらのサンプリング試料を用いて HVA に接種し、放線菌のコロニー数を測定した。

3). 放線菌分離株の多様性

得られた分離株は純粋分離後に DNA 抽出し、PCR にて 16S rDNA を増幅、ダイレクトシーケンスにて塩基配列を決定した。得られた配列は EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>) にて既知種との相動性検索を行った。また、分離株はすべて研究室のマイナス 80 度のデュープフリーザーにて凍結保存を行った。なお、既知種との相動性が 98.7% 以上を当該種として計上し、それ未満を未知種として計上した。

4). 新種と推定された放線菌の分類学的な性状と希少種の保全

今回得られた分離株の中から複数の未知種(新種)と推定された放線菌がえられた。この中から系統解析を行った結果から *Blastococcus* sp. ROH 108 株と *Streptomyces* sp. ROI102 株を選抜した。これら菌株に近縁な既知種を JCM より取り寄せ、生理性状試験などを行った。

4. 研究成果

1). 赤土流出モデルにおける陸生放線菌の生存調査

放線菌は様々な環境中から分離することができるが、1 g あたりの生息密度が最も高いのは土壌である。一般的な土壌に放線菌は 10^6 CFU/g 程度は存在しているといわれている。今回、比較として蒸留水で 1 週間浸漬した場合、 10^7 CFU/g が存在していた。これは、浸漬していた間に放線菌が増殖していたと考えられる。一方、海水で浸漬した場合、蒸留水と比べて有意に少ないが、海水の浸漬で陸生の放線菌は減少あるいは死滅しないことが初めて明らかとなった。

表 1 赤土流出モデルによる赤土の人工海水浸漬実験

サンプル	放線菌数(CFU $\times 10^6$ / g of dried soil)	
	蒸留水	ASW
赤土 1	24.0 \pm 3.0	12.24 \pm 4.61
赤土 2	32.1 \pm 2.41	21.98 \pm 5.46
赤土 3	35.9 \pm 4.42	27.25 \pm 2.26

2). 赤土、沿岸海域、沖合海域からのサンプリングと放線菌の分離

赤土とその流出履歴のある沿岸海域とリーフ内・外から放線菌の分離を行った結果（図 1）赤土自体には 10^7 程度の放線菌が存在していた。さらに沿岸海域の中でも赤土の流出履歴のあるサンプル D、E、G はすべての海域の中で最も高い放線菌数を示していた。一方、海流の影響で同じ沿岸でも赤土の流出履歴の少ないサンプル W および X では放線菌数は少なくリーフ内の菌数と大きな差は確認されなかった。リーフ外は放線菌が検出されないサンプルがあったものの、放線菌の分布数は極めて少ないということが確認された。以上のことから、赤土の流出は沿岸の中でも流出履歴の多い場所で放線菌数の上昇をもたらすと考えられる。

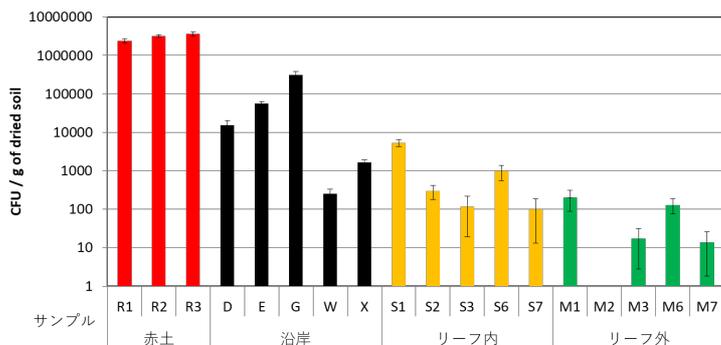


図 1、赤土および赤土流出海域における放線菌の分布数

3). 放線菌分離株の多様性

赤土の流出履歴の多い沿岸（3点）から 86 株、少ない沿岸（2点）から 24 株の放線菌が得られ、種レベルでの多様性を *Micromonospora* 属および *Streptomyces* 属の間で比較を行った結果を表 2 に示した。結果は分離株中における各分類群の割合で示している。沿岸 多では *Streptomyces wuyuanensis* の分布数が最も多く、次いで *Micromonospora marina* が多かった。この 2 種について文献調査を行ったところ、*Streptomyces wuyuanensis* は土壌からの分離報告があった。*Micromonospora marina* は海砂からの分離例が報告されている。いずれの種も HVA という腐植酸を単一の炭素源とした分離培地で生育してきていることから、土壌に由来する菌であると考えられる。一方、沿岸 小では *Micromonospora marina* が多く分離されていた。この他に新種と推定される *Blastococcus* 属がリーフ外から検出され、沿岸 大およびリーフ内から *Streptomyces* 属が得られている。

表 2 . 赤土流出履歴の異なる海洋試料から分離れた放線菌の多様性の違い

属	種	沿岸 多 (流出履歴：多)	沿岸 小 (流出履歴：小)	
<i>Micromonospora</i>	<i>aurantiaca</i>		4.2	
	<i>chalcea</i>	1.2		
	<i>chersina</i>	1.2		
	<i>coxensis</i>	1.2	4.2	
	<i>echinospora</i>	2.3		
	<i>endophytica</i>		4.2	
	<i>haikouensis</i>	4.7		
	<i>harpali</i>	2.3		
	<i>marina</i>	17.4	37.5	
	<i>wenchangensis</i>	1.2		
	<i>Streptomyces</i>	<i>albolongus</i>	1.2	
		<i>bacillaris</i>	1.2	4.2
		<i>caelestis</i>	1.2	
		<i>carpaticus</i>	1.2	4.2
<i>cellostaticus</i>		1.2		
<i>chumphonensis</i>		1.2		
<i>coeruleoprunus</i>		1.2		
<i>endus</i>		1.2		
<i>flavotricini</i>		1.2		
<i>flavoviridis</i>		8.1		
<i>geysiriensis</i>		1.2		
<i>glauciniger</i>		2.3		
<i>griseorubens</i>			4.2	
<i>hygroscopicus</i>		1.2		
<i>lannensis</i>			8.3	
<i>mauvecolor</i>		1.2		
<i>misionensis</i>		2.3		
<i>psammoticus</i>		2.3		
<i>rameus</i>			4.2	
<i>speibonae</i>		8.3		
<i>spinoverrucosus</i>		4.2		
<i>spongiicola</i>		8.3		
<i>wuyuanensis</i>	38.4	4.2		
sp.	1.2			

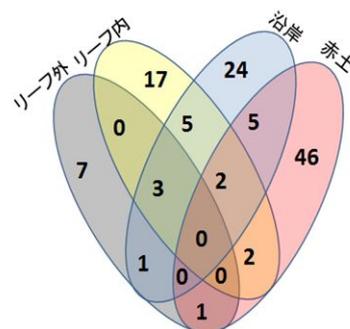


図 2. 赤土および赤土流出海域における放線菌の種レベルの重複

今回得られた放線菌の種レベルでの重複を赤土および赤土流出海域、リーフ内、リーフ外で比較した結果をベン図にて示した(図2)。その結果、すべての海域で共通してみられる分類群は無かった。一方で、赤土および沿岸、リーフ内の間ではそれぞれ共通して得られる分類群が存在しているものの、リーフ外と他の海域それぞれから共通して検出された分類群は非常に少ないことが明らかとなった。しかしながら、リーフ外からの放線菌はもともとの菌数が少なかったこともあり、今後はより多数の分離株を得ることで正確な分布比較を行うことができると考えられる。

4). 新種と推定された放線菌の分類学的な性状と希少種の保全

本研究で得られた放線菌のうち、新種と推定される株、海洋に特異的に生息すると考えられた株(下記8株)について製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター(NBRC)に寄託することで保全を行った。この他に *Blastococcus* 属の新種推定株を ROH108 株については、現在、寄託を行っている最中である。

- (1) *Streptomyces* sp. ROS301 (NBRC 113397)
- (2) *Streptomyces* sp. RIH403 (NBRC 113398)
- (3) *Micromonospora chaiyaphumensis* RIH515 (NBRC 113399)
- (4) *Streptosporangium* sp. 4KM104 (NBRC 113400)
- (5) *Kocuria oceani* ROH501 (NBRC 113401)
- (6) *Micromonospora marina* RII406 (NBRC 113402)
- (7) *Streptomyces* sp. RII502 (NBRC 113403)
- (8) *Nocardia* sp. ROI203 (NBRC 113464)

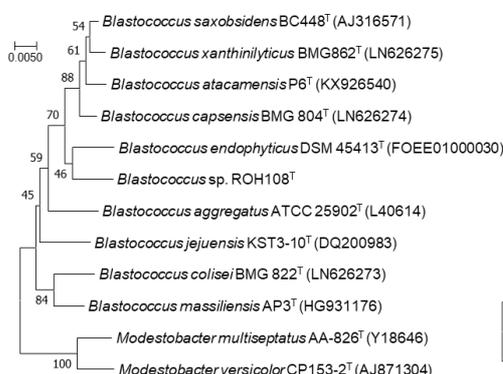


図3. *Blastococcus* sp. ROH101 の 16S rDNA に基づく系統解析

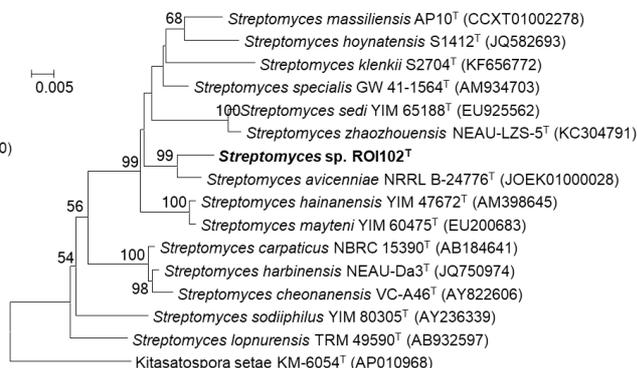


図4. *Streptomyces* sp. ROI102 の 16S rDNA に基づく系統解析

今回、解析対象とした分離株 *Blastococcus* sp. ROH108 株は *Blastococcus endophyticus* と近縁であった。分離株 *Streptomyces* sp. ROI102 株は *Streptomyces avicenniae* と最も近縁であり、この2種で単一のクレードを形成していた。この他に *Streptomyces burgazadensis* と近縁な株もあったが、国内で基準株を入手する事が難しく、以後の分類研究には用いなかった。Nocardia 属 2 株はともに *Nocardia xestospongiae* と近縁であることが分かったが、生育が遅いため、以後の分類研究には用いなかった。分離株 *Blastococcus* sp. ROH108 株と近縁種の酵素活性を APIZYM で評価したところ、ロイシンアリルアミダーゼを含む 5 種類の酵素活性が陽性であり、エステラーゼリパーゼを含む 3 種類の酵素活性は微弱な陽性反応を示し、アルカリフォスファターゼを含む 11 種類の酵素活性は陰性であった。近縁種と比べ 3% NaCl を含有する培地において特に生育が良いことが分かった。一方、分離株 *Streptomyces* sp. ROI102 株は 40°C での生育、5% NaCl 含有培地での生育、硝酸塩の還元、硫化水素の発生などにおいて近縁種 *S. avicenniae* と明確に区別する事ができた。

本研究では、赤土流出が海洋の放線菌にどのような影響を与えるのかについて世界で初めて調査を行った。赤土流出は日本のみならず、東南アジア諸国の島嶼において共通の環境問題であり、畑地化が進むほど大きな影響を海洋環境に与えられられる。そもそも赤土流出の問題として知られているのが、サンゴの白化である。赤土は粒子が細かく沈殿するまでに時間がかかるという性質があり、長期間にわたって海中への日光の照射を妨げるため、サンゴなどの生態系に悪影響を与えている。今回、微生物の中でも放線菌に着目して、赤土流出海域における放線菌の分布数を調査した結果、赤土の流出履歴の多い海域では赤土に由来すると考えられる放線菌が多く残存していることを明らかにした。一方で、リーフ外では赤土の影響は少なく、海洋由来と特定できるような放線菌が見出すことができた。新種推定株 2 株については分類学的な性状調査を行い、新種として提案可能であることが示唆されたものの、DNA-DNA ハイブリダイゼーションなどの追加の分類学的試験を行う必要がある。今後は、新種提案を行うべく糖の資化性試験などを行う予定である。

5. 主な発表論文等
なし

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕
ホームページ等
<https://hyamamura.wixsite.com/appl-microbiology>