

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 28 日現在

機関番号：82706
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22510250
 研究課題名（和文） センサス・オブ・マリンライフ日本参画に向けた貴重深海バイオリソース持続的利用基盤
 研究課題名（英文） Establishment of sustainable bioresources of deep-sea creatures: in the course of Census of Marine Life.
 研究代表者
 秦田 勇二（HATADA YUJI）
 独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・チームリーダー
 研究者番号：20399562

研究成果の概要（和文）：

研究代表者らの所属する海洋研究開発機構は潜水艇を用いて、深海から新種の高頻度で次々と検出している。新規性の高い生物から医薬、化粧品、食品、工業分野に有用な新規物質の発見が期待できるが、ここで問題なのは、深海多細胞生物は「捕獲できる個体数が大変僅か」なことである。そこで本課題では“希少生物”を「増幅できるバイオリソース」に変換するという新たな試みを遂行した。本課題期間中に深海多細胞生物からの遺伝子ライブラリー（34 生物種）や細胞ライブラリー（4 生物種）を作製した。

研究成果の概要（英文）：

Using submersibles, the Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology Institution has found new species of deep-sea multicellular organisms with a high frequency. The novel substances isolated from such newly discovered organisms are expected to be valuable in pharmaceutical, cosmetic, food and industrial applications. However, the problem is that the number of the deep-sea organisms that can be captured using submersibles is very limited. We, therefore, made a new attempt to convert the rare deep-sea organisms into "bioresources that can be amplified." We successfully established the genomic libraries from 34 species of the deep-sea organisms and the cell libraries from four species.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：資源保全学、資源保全学

キーワード：深海生物、バイオリソース、遺伝子、細胞

1. 研究開始当初の背景

 ■ 新規性の高い深海由来の生物

■深海生物調査

海洋研究開発機構では無人・有人深海調査船を使用し、これまで世界中の深海を探索し、海洋、特に深海領域の生物の新規性・多様性の把握をテーマに生物調査を行っている（文献1）。その過程で、新種の多細胞生物が深海環境から高い頻度で検出されており、今後も発見される生物種は増加し続けると想定される。深海の生物が高い新規性・多様性を持つ要因としては、深海は高い水圧等の特殊環境であることに加え、深海には海底から湧出してくる硫黄や硝酸などを利用した化学合成エネルギーによる一次代謝（二酸化炭素固定・新エネルギー開発に期待）が支える豊かな生物環境や、200℃を超える熱水が噴出している耐熱性生物の棲む環境（耐熱性素材、耐熱性酵素など期待）、クジラなど大型生物の死骸を栄養源・棲家として形成される生物群集特殊環境（生物間の低分子物質のやり取り、免疫など）等、興味深いそして良質な生物資源として期待される環境が多数存在している。一方、深海環境から新種微生物も高い頻度で検出されている。当機構では現在で約9,000種の深海由来の微生物を単離・保管している。代表者らはこれら深海の微生物から新規有用物質（世界で初めて発見された酵素など、文献2）の発見を行ってきた。医薬、食品、工業、研究などの分野への応用を目指した企業との共同研究成果等からその幾つかは既に産業化に結びついている（文献3）。この様に、新規な生物からは新規な有用物質が効率よく発見できると考えられ、深海の新種多細胞生物にも応用展開が大いに期待できる。

■深海生物は新規性が高く新バイオリソースとして期待できる。しかし個数は多く確保できない

深海環境から発見されている深海生物は

高い可能性を秘めたバイオリソースと言える。しかし深海生物の捕獲には深海調査船の利用が必然的である。また、深海はそのほとんどが低温領域であり生物活動速度は浅海等と比較して緩やかと考えられ、深海特殊環境に群集する生物も長い年月をかけて成長したと推定され、生物多様性の保全の為に深海領域からの生物の乱獲は避けるべきである。深海の多細胞生物は、特殊環境（低い温度、高い圧力、必須化学物質の要求など）でのみ増殖できることから生物個体を飼育培養によって増やすことが可能となるまでには多大な検討時間が必要であり、しかも個体が倍増するためには多大な生育時間を必要とすると判断されている。

文献1：「潜水調査船が観た深海生物（深海生物研究の現在）」藤倉克則，丸山正，奥谷喬司，東海大学出版会，（2008）

文献2：「酵素開発利用の最新技術」；今中忠行監修、深海微生物からの有用酵素の探索、秦田勇二、大田ゆかり、日高裕子、能木裕一、シーエムシー出版（2006）

文献3：「マリンバイオテクノロジーの現場から；深海微生物に期待」、秦田勇二，宮崎征行，大田ゆかり、化学と生物 Vol. 51 No. 2、104-110pp、（2013）

2. 研究の目的

研究代表者らの所属する海洋研究開発機構は深海領域の生物調査を行っており、深海から新種の多細胞生物が高い頻度で次々と検出されている。新規性の高い生物から新規有用物質が発見されると期待でき、医薬、化粧、食品、工業分野などに有用な新規物質の発見が期待できる。しかしながら、ここで問題なのは、深海多細胞生物は「捕獲できる個体数が大変僅か」であり、さらに「飼育培養によって個体を増やすことが大変困難」な

ことである。僅かな限られた個体から有用物質を探索することは困難である。そこで研究代表者らは“希少生物”を「増幅できるバイオリソース」に変換するという新たな試みを目指した。つまり深海多細胞生物からの遺伝子ライブラリー（増幅可能）や細胞ライブラリー（増殖可能）を作製し、これらをリソースとして有用物質の探索・性質解析・応用検討を展開していく。従って本課題研究の目的は深海生物群を貴重なバイオリソースとして有効に利用する為に、深海由来多細胞生物の遺伝子ライブラリー・細胞ライブラリーを作製することであり、同時にその為の効率的な手法等も開発することにある。

3. 研究の方法

深海領域より発見された多細胞生物を遺伝子ライブラリー（増幅可能）・細胞ライブラリー（増殖可能）化する為に以下(1)～(3)を行った。

(1) 深海多細胞生物からゲノムDNAを抽出→数種の制限酵素で切断し、ゲノムDNAを断片化→コスミドベクターおよび発現ベクターに導入し、ライブラリー化する。一方、生物内で発現（機能）している遺伝子をライブラリー化するために、深海から捕獲された生物からトータル mRNA を調製→逆転写酵素にてcDNAを作製→これをベクターDNAに導入し、ライブラリー化する。

(2) 深海多細胞生物より→剥離した単細胞群を調製→これを一旦液体窒素で保存する、と同時に残りの細胞を用いて培養可能条件を探索する。培養温度、培地成分、培地 pH などの詳細な条件を検討し、細胞株を形成させ最適な増殖条件を検討したのち→増殖後の細胞株を-80℃にて保存する。さらに、一定期間凍結保存後に解凍し、効率よく増殖が可能であるかどうかの確認も行う。仮に保存状態から再生させた際にその効率が悪い場合

は、保存条件の再検討ならびに再生効率を向上させる条件の検討も同時に行う。

(3) ライブラリーの評価として、作製したライブラリーの一部より有用物質を探索・性質解析・応用検討するために用いてみる。

4. 研究成果

本課題研究期間中にオオグチボヤやユメナマコをはじめとする深海由来多細胞生物 29 種からの遺伝子ライブラリーの構築に成功した。またハオリムシなど 5 種の深海生物から mRNA サンプルを調製し、これらを cDNA に変換した後、誘導発現用ベクターに導入することで、より即戦力的な遺伝子ライブラリーの作成にも成功した。実際に本ライブラリーより、未利用セルロース→バイオエタノール生産利用に向いている酵素遺伝子の取得、あるいは新規の蛍光タンパク質遺伝子にも成功しており、本ライブラリーの有用性が確認された。一方、22 種の深海多細胞生物の体組織より単細胞群を調製し液体窒素で瞬間冷凍し、そのまま-160℃にて凍結した。さらに細胞ライブラリーの作製に関してはアッコウの仲間属する魚種など深海由来多細胞生物 4 種の細胞の継体培養に成功した。このうち 2 種に関しては既に不死化細胞であることまで確認できている。生物サンプルとしてはエタノール浸漬保存サンプルよりも凍結保存サンプルの方がより質の高い遺伝子ライブラリーが調製できるという見解も得られた。また、調製できた細胞ライブラリーの中の 1 種に関しては目的物質生産能力の高い大変有用な特殊宿主細胞であることが判り、特許出願に至った。今後は同様に深海生物のライブラリー化を進めるとともに、これらの持続再生可能な遺伝子ソースを有用物質などの探索に用いてみて、その実用性を詳細に評価する。

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1件)

Kobayashi H, Hatada Y, Tsubouchi T, Nagahama T, Takami H.
The Hadal Amphipod *Hirondellea gigas* possessing a unique cellulase for digesting wooden debris buried in the deepest seafloor.
PLoS One. 2012;7(8):e42727,
doi: 10.1371/journal.pone.0042727.
査読有

[学会発表] (計3件)

1、小林英城、秦田勇二、坪内泰志、高見英人「超深海性ヨコエビが生産する新規セルラーゼの精製と性質」日本農芸化学会 2013 年度大会(2013. 03. 27, 仙台)

2、小川智久、秦田勇二、鶴若祐介

「Amazing characteristics of the KSC cell line」The 35th Annual Meeting of The Molecular Biology Society of Japan (2012. 12. 11, 福岡)

3、鶴若祐介、小川智久、秦田勇二

「Our fish cell can change」The 35th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (2012. 12. 11, 福岡)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：カワハギ由来の細胞株

発明者：鶴若祐介、小川智久、秦田勇二

権利者：独立行政法人海洋研究開発機構

種類：特許

番号：2012-169378

出願年月日：2012/07/31

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.jamstec.go.jp/biogeos/j/mbrp/mber/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秦田 勇二 (HATADA YUJI)

独立行政法人海洋研究開発機構・

海洋・極限環境生物圏領域 チームリーダー

研究者番号：20399562

(2) 研究分担者

鶴若 祐介 (TSURUWAKA YUSUKE)

独立行政法人海洋研究開発機構・

海洋・極限環境生物圏領域 技術研究副主任

研究者番号：30533856

西 真郎 (NISHI SHINRO)

独立行政法人海洋研究開発機構・

海洋・極限環境生物圏領域 技術副主事

研究者番号：50416004

(2011年度-2012年度のみ)

大田 ゆかり (OHTA YUKARI)

独立行政法人海洋研究開発機構・

海洋・極限環境生物圏領域 主任研究員

研究者番号：40399572

(2010年度のみ)

(3) 連携研究者

なし