

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 8 日現在

機関番号：34413

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780198

研究課題名（和文） 深海環境に生息する微生物資源を利用した抗ウイルス活性の探索

研究課題名（英文） Screening of anti-virus activities from deep-sea-adapted bacteria

研究代表者 河野 広朗 (Kawano Hiroaki)

大阪薬科大学・薬学部・ポストドクター

研究者番号：60409133

研究成果の概要（和文）：本海、相模湾、日本海溝の海底 11 ヶ所の底泥から深海微生物を分離した。分離した微生物を深海微生物ライブラリーとして保存するとともにその 16S rDNA の塩基配列を決定することで、その実態および多様性を明らかにした。これらの微生物 1000 株を培養し、その培養上清を抗ウイルス活性探索用に保存した。また、抗ウイルス活性（核外輸送活性）スクリーニングに向けた新規細胞株 EGFP/NLS/NES を樹立することにも成功した。培養上清の混合液の 13 種に抗インフルエンザウイルス活性が見られた。

研究成果の概要（英文）：We isolated deep-sea-adapted bacteria from deep-sea-mud samples collected at the Japan sea, Sagami bay, and Japan trench. These bacteria were stored as a bacterial library and their diversity was analyzed based on the 16S rDNA nucleotide sequences. One thousand bacteria were cultured and the resulting supernatants were stored so as to be used for anti-virus activity screening. In addition, establishment of EGFP/NLS/NES cell line which will be used for anti-virus activity screening was successfully achieved. Furthermore, we found significant anti-influenza virus activities in 13 supernatant mixtures of deep-sea bacterial cultures.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：微生物、深海

## 1. 研究開始当初の背景

今日までに新規生理活性の探索を目的として多くのグループが海洋微生物の収集を行って来ている。しかしながら海洋に生息する微生物は、深海深度に依存して取得が難しくなることや、更にはその培養システムが十分に確立されていないためにその生態や資源としての有用性も未知な部分が多く応用が進んでいないのが現状である。特に深海のような高水圧、低温、暗黒で特徴づけられる極限環境に生息する深海微生物は、新規遺伝子資源及び微生物資源として、バイオ分野におけ

る研究開発や産業活動への応用が期待されはじめ、深海土壌から難培養な微生物のゲノムを環境中から直接抽出し、その遺伝子機能から生態を探ろうとするメタゲノムプロジェクトも行われている。しかし、本方法の欠点として存在する遺伝子が必ずしも機能しているわけではないこともあり、深海微生物の生態は未知なままとっている。同時に微生物資源からの新規生理活性物質の探索は遅れている現状にある。その最大の理由は、これまでの研究グループが新規生理活性探索用のスクリーニング系を同時に樹

立していない事が原因である。当研究室では、これまでに種々の抗ウイルス活性スクリーニング系を樹立しており、本系を利用することで効果的に新規生理活性の探索が行えるようになって来ている。近年次々と新規ウイルスが出現しており、その薬剤耐性化とともに大きな社会的問題となっており、本研究では、深海微生物を新規微生物資源として抗インフルエンザ薬の探索に重点をおき研究を進める。

地上の微生物資源は、古くから医薬品への利用を目指した生理活性物質探索の貴重な資源として、応用されて来ている。今日では、地球表面の7割を占める海洋が未開拓な微生物資源宝庫として注目され、多くのグループがその資源獲得及び微生物ライブラリー構築に乗り出している。海洋微生物収集は、国内では、北里大学海洋バイオテクノロジー釜石研究所において創薬資源として期待され取り組まれており、ライブラリー化が行われ、その中から抗生物質等の新規生理活性物質が見出されている。国外では、海洋バイオテクノロジー企業である英国のアクアファーム・バイオディスカバリー社が海洋微生物のライブラリーを作製し、これを天然化合物の発見エンジンとして医薬品、栄養補助食品、生物活性天然化合物の開発へ利用し、シンガポールのマーライオン製薬は海洋微生物を含む天然物ライブラリーを所有し、新規抗生物質探索等に利用している。

## 2. 研究の目的

申請者が所属する研究室においては従来から、長崎県近海から海洋微生物を収集し、当該地域の海洋汚染の指標とするべくその群集構造解析を行って来ている (Herizo et al., 2007, *Hydrobiologia* 583, 205-212)、一方、収集した海洋微生物からの抗ウイルス活性も探索してきた。今回は深海微生物を分離、分類することによって、その実態を明らかにする。最終的には、分離した微生物の培養上清から新規の抗ウイルス活性を探索することで新薬創世へ向けたリード化合物を同定し、その作用メカニズムの解明を行う。研究期間内に行う研究としては、独立行政法人海洋研究開発機構から深海深度 1,000~10,000 m から採取し保管してある底泥を入手し、そこから分離した微生物の 16S rDNA 遺伝子を解析し同定を行う事によって、その実態を明らかにし、深海微生物ライブラリーを構築する。分離した微生物の培養上清をインフルエンザやヘルペスウイルス等のウイルス感染細胞に *in vitro* で添加する事によって、新規抗ウイルス活性を探索する。見出した抗ウイルス活性物質は精製し、構造決定を行う。最終的に、ウイルス増殖ステップのどこが抑制されるのかを詳細に評価することによって、その

作用メカニズムの推定までを行いたいと考えている。また、抗ウイルス活性のターゲットの一つとしてウイルスゲノムやウイルス活性化タンパク質の核内から核外への核外輸送を特異的に阻害する核外輸送阻害活性を深海微生物培養上清から探索することも視野に入れ、核外輸送阻害活性レポーター細胞株に関しても樹立を行うことにした。

## 3. 研究の方法

### (1)深海微生物の分離とライブラリーの構築

日本海溝 (深度 5000-6500 m)、日本海 (深度 3000 m)、相模湾 (深度 1000 m) から採取した 11 種の底泥 (表 1) をマリンプロス 2216 寒天培地上に塗布し、20°C で 1 週間培養を行った。寒天培地上に出現した微生物コロニー数をカウントし、底泥 1g 当たりの colony forming unit (CFU) を算出した。各サンプリングポイントについて、96 株ずつ 96 well plate に添加したマリンプロス液体培地に植菌し 20°C で 1 週間培養した後、グリセロールを最終濃度 10% になるように加え、-80°C フリーザーにライブラリーとして凍結保存した。保存株を 5 ml のマリンプロス液体培地で 1 週間培養し、遠心分離を行うことで培養上清とペレットを分離し、上清を -80°C で保存した。ペレットから染色体 DNA をフェノールクロロホルム処理によって抽出した。得られた染色体 DNA を鋳型として、プライマー 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') と 1492r (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3') を使用した PCR 法によってそれぞれの微生物の 16S rRNA 遺伝子を増幅した。本遺伝子産物 1465 塩基の内の 5'末端側約 500 塩基の配列を DNA シーケンサーで決定し、その結果をデータベース BLAST にて照合する事でその属名及び種名を同定した。

表 1 深海底泥サンプル詳細と分離微生物数

サンプリングポイント	簡略番号	サンプル名	cfu/1g soil
日本海溝 (5000-6500m)	①	7K399_Mb-2	6.9x10 <sup>6</sup>
	②	7K399_Mb-4	1.8x10 <sup>6</sup>
	③	6K950-22	3.9x10 <sup>6</sup>
	④	6K950-23	1.4x10 <sup>5</sup>
	⑤	6K953-24	6.9x10 <sup>4</sup>
相模湾 (1000m)	⑥	HPD#442-4	1.2x10 <sup>7</sup>
日本海 (3000m)	⑦	6K960_Cbk(9)	8.0x10 <sup>6</sup>
	⑧	YK0809#1075	2.0x10 <sup>6</sup>
	⑨	YK0809#1079_Bk	2.8x10 <sup>5</sup>
	⑩	YK0809#1079_mat	1.5x10 <sup>7</sup>
	⑪	YK0809#1079_mat	1.8x10 <sup>5</sup>

### (2)核外輸送阻害活性スクリーニング用細胞株の樹立

まず、緑色蛍光タンパク質 GFP 発現プラスミドの GFP コーディング領域の C 末端側に PKI の核外輸送シグナル (NES) を導入した pEGFP-NES プラスミドをベースに、その NES シグナルをコードする配列の上流にプライ

マーアニーリング法で作製した SV40 large T antigen に由来する核内局在シグナル (NLS, PKKKRKV) をコードする配列を含む遺伝子断片を導入し pEGFP-NLS-NES プラスミドを作製した。本プラスミドを大腸菌コンピテンとセルに導入し、培養後精製した。pEGFP-NLS-NES プラスミドをインフルエンザウイルスに高感受性な犬腎臓由来 Madin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞にトランスフェクトし G418 薬剤選択圧のもと2週間培養し、薬剤耐性かつ GFP 蛍光を有するクローンを取得した。本細胞に核外輸送阻害剤 leptomycin B (LMB) を添加し、核外輸送阻害活性検出能を野生型 GFP-MDCK 株、GFP/NES-MDCK 株と共に評価した。

### (3) 樹立細胞株の評価

GFP-MDCK、GFP/NES-MDCK、及び GFP-NLS/NES-MDCK 細胞をそれぞれ 24 well plate の well 底に敷いたガラスカバースリップに播種した。24 時間後、10 ng/mL の LMB を添加し、1 時間及び 3 時間培養した。細胞を 1× PBS で洗浄後、paraformaldehyde で固定し、Hoechst33342 で核染色した。ガラスカバースリップを取り出しスライドグラスにマウントした後、蛍光顕微鏡によって、GFP 融合タンパク質の核/細胞質における分布を観察した。

同様に LMB の感受性評価をおこなった。上述したように細胞を播種し、24 時間後、10 ng/mL の LMB を添加し、さまざまな濃度の LMB (10 ng/mL, 1 ng/mL, 0.1 ng/mL, 0.03 ng/mL, 及び 0.01 ng/mL) を添加し 3 時間培養を行った。上述したものと同様に GFP 融合タンパク質の核/細胞質における分布を観察した。

### (4) 抗ウイルス活性の評価

培養上清の抗ウイルス活性をヘルペスウイルス (HSV-1)、インフルエンザウイルス (A/WSN/33) に対して調べた。まず、96well プレートに Vero 細胞 ( $6.0 \times 10^4$ /well) 及び MDCK 細胞 ( $3.0 \times 10^3$ /well) を播種しておき、そこに培養上清 10 種の混合溶液 55 サンプル (計 550 株の培養上清) を 1% 及び 10% で添加した。そこに HSV-1 ( $1800\text{TCID}_{50}$ ) 及び A/WSN/33 ( $100\text{TCID}_{50}$ ) をそれぞれ感染させ 3 日間培養し、細胞を固定後、アミドブラック (HSV-1) 及びクリスタルバイオレット (A/WSN/33) で染色した。染色後の各 well における吸光度を測定し、抗ウイルス活性を評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 深海微生物の分離とライブラリーの構築

各海溝及び海域の底泥サンプルを培養した結果、すべてのサンプルにおいてコロニーが

得られた (表 1、図 1)。各サンプリングポイントの底泥 1 g 当たりの CFU は、平均で  $10^6$  であった。本結果から地上における一般土壌における CFU 比較してほぼ同等の分離可能微生物数が存在していることが明らかとなった。これらの菌株を各サンプリングポイントについて、96 株ずつ計 1056 株をライブラリー化し保存した。

### (2) 深海微生物の同定

分離した微生物の多様性を調べるために 16S rDNA の塩基配列に基づいた同定を行った。日本海溝のサンプリングポイント①7K399-Mb2 と②7K399-Mb4 の2か所において、それぞれ 46 株、50 株解析した結果、ポイント①7K399-Mb2 においては分離された株のすべてが *Staphylococcus* 族に分類される細菌であった。この中で主な株としては、*Staphylococcus aureus* や *Staphylococcus equorum* と高い相同性を示した。またポイント②7K399-Mb4 においては *Kocuria* 族細菌 *Microbacterium* 族細菌、が主に同定され、他に数株の *Bacillus* 族細菌及び *Staphylococcus* 族細菌、*Kytococcus* 族細菌も同定された。

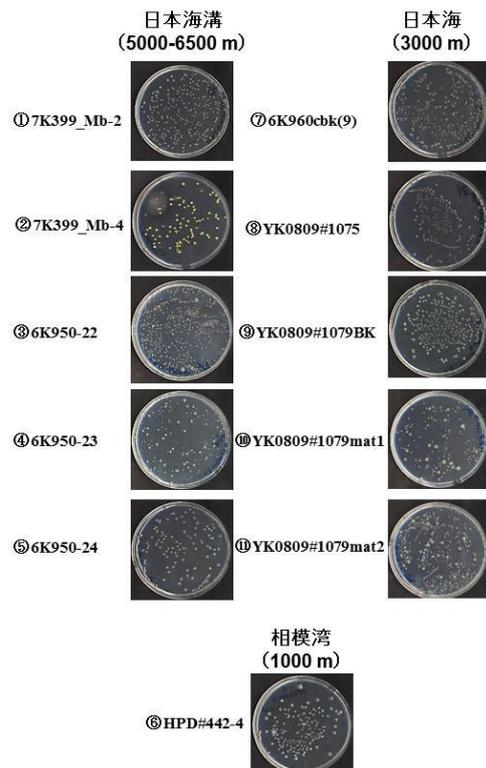


図 1 分離した深海微生物の寒天培地上でのコロニーの様子

### (3)核外輸送阻害活性スクリーニング用細胞株の樹立

抗ウイルス活性のターゲットの一つとして核外輸送阻害活性を深海微生物から探索するための新規細胞株樹立を目的にし、MDCK細胞に作製した pEGFP-NLS-NES プラスミドをトランスフェクトした。導入処理後の細胞を G418 存在下で、培養した結果、3つのクローンコロニーが得られた。それらクローン株をそれぞれ単離し、LMB 処理を行うことで、GFP 蛍光の顕著な核蓄積を示した1クローンを選抜した。本細胞株を GFP/NLS/NES-MDCK と命名した。

GFP/NLS/NES-MDCK の核外輸送活性存在下で検出感度を野生型 GFP-MDCK 株、GFP/NES-MDCK 株と比較するために 10 ng/mL LMB 存在下で 1、3 時間後の GFP 蛍光の分布と蛍光強度を蛍光顕微鏡観察によって比較した (図 2)。その結果、GFP/NES-MDCK 株は過去の報告同様、主に核への蛍光蓄積が見られた。これに対して GFP-MDCK 株では、顕著な変化は見られなかった。GFP/NLS/NES-MDCK 株は GFP/NES-MDCK 株と比較して、より顕著な核への蛍光蓄積が見られた。

LMB の感受性評価をおこなった結果、GFP/NLS/NES-MDCK 細胞において、0.01 ng/ml の低濃度の LMB 添加によっても核内にかなりの GFP の蓄積が見られた (図 3)。一方で過去に樹立した GFP/NES-MDCK 細胞は、LMB 濃度が 1 ng/mL 未満では核内への GFP の顕著な蓄積は見られなかった。従って GFP/NLS/NES-MDCK 株は GFP/NES-MDCK 株と比較し約 100 倍高い核外輸送阻害感受性を示すことが明らかになった。GFP/NLS/NES-MDCK 細胞が感受性を示す濃度 (0.01 ng/ml) は他のグループが構築した他細胞ベースの樹立株のレスポンス濃度領域 (5-10 ng/ml) よりも顕著に低いことが明らかとなった。

これらの結果は本研究において新規に樹立した GFP/NLS/NES-MDCK 株が核外輸送阻害活性探索により有用であることを示した。本細胞による活性評価は、感染性のある危険なウイルスを必要とせずに、さらに一般に使用される培地において継代保持できるためハイスループットな解析に向けて非常に有用であると考えられた。現在、本細胞株を用いた深海微生物培養上清からの核外輸送阻害活性探索も並行して行っている。

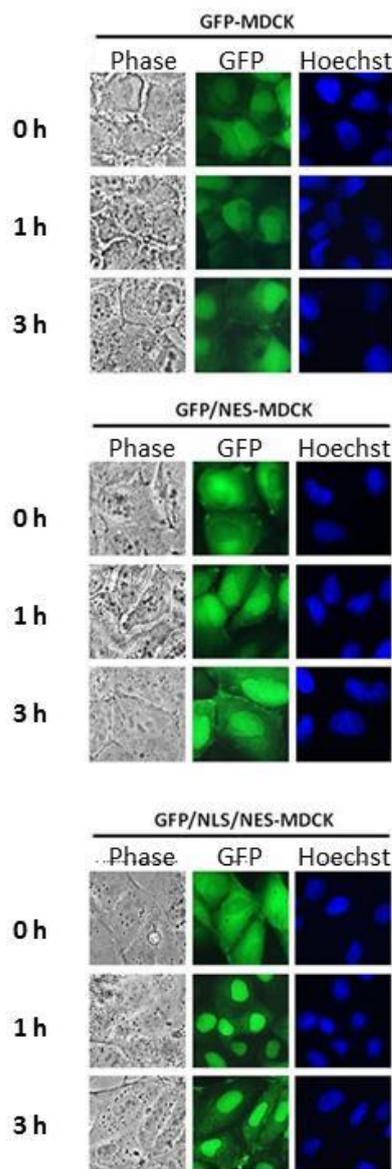


図2 核/細胞質局在のタイムコース解析  
細胞株、GFP-MDCK、GFP/NES-MDCK、  
GFP/NLS/NES-MDCK を 24 時間培養し、10  
ng/mL LMB を添加した。Hoechst 33342 で核  
染色を行った。核/細胞質の GFP 融合たん  
パク質の局在を蛍光顕微鏡 (40×) で観察し  
た。

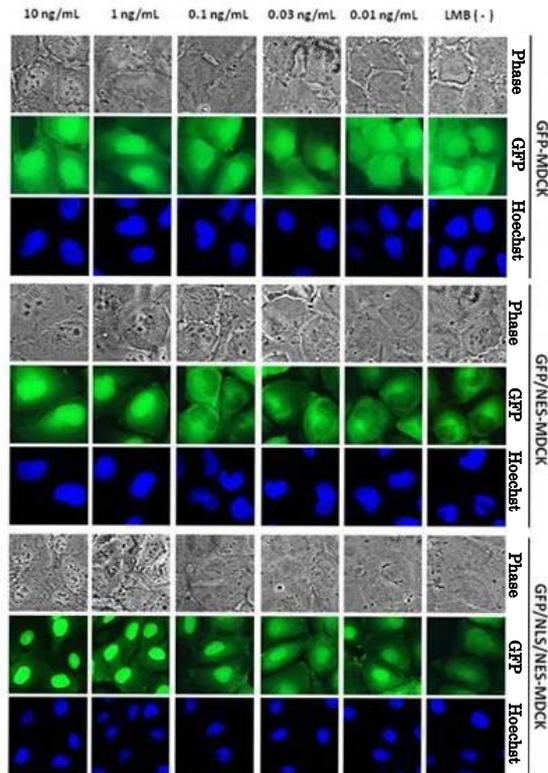


図3 LMBのタイトレーション  
細胞株、GFP-MDCK、GFP/NES-MDCK、  
GFP/NLS/NES-MDCK に異なる濃度の  
LMB を添加し 3 時間培養した。Hoechst  
33342 で核染色を行い核/細胞質の GFP 融合  
タンパク質の局在を蛍光顕微鏡 (40×) で観察  
した。

#### (4) 抗ウイルス活性の評価

結果、抗ヘルペスウイルス活性に関しては、  
顕著なものは見られなかった。一方、抗イン  
フルエンザウイルス活性を示す培養上清混  
合溶液が 13 種存在した (図 4)。現在、これ  
らの混合液を構成する菌株 10 種それぞれの  
培養上清の抗インフルエンザウイルス活性  
を評価している。

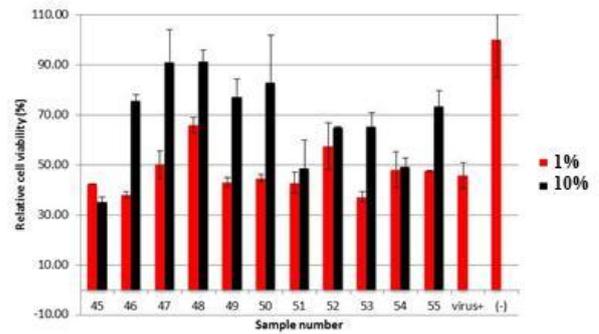


図4 抗インフルエンザウイルス活性  
インフルエンザウイルス A/WSN/33 株に対す  
る培養上清混合液の影響を評価した。縦軸は  
被感染細胞 MDCK の生存率、横軸は上清の  
混合液サンプル番号を示している。上清混合  
液 47、48、49、50 等に抗インフルエンザウ  
イルス活性が見られている。

#### 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)

Abkallo HM, Kawano H, Watanabe K,  
Kobayashi N. Establishment of a new  
cell-based reporter system for performing  
sensitive screening of nuclear export  
inhibitors. Drug Discov Ther, 査読有、No. 5,  
2013, pp. 286-292

DOI : 10.5582/ddt.2011.v5.6.286

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

河野 広朗 (Kawano Hiroaki)

大阪薬科大学・ポストドクター

研究者番号 : 60409133