

平成30年6月15日現在

機関番号：82708

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18730

研究課題名(和文) 実養殖環境下におけるスサビノリ共生細菌の生態と共存機構に関する研究

研究課題名(英文) Study of the ecology of *Pyropia yezoensis*-symbiotic bacteria and coexistence mechanism in aquaculture environments

研究代表者

福井 洋平 (Fukui, Youhei)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・中央水産研究所・研究員

研究者番号：40565561

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)：本研究では、ノリ養殖環境における共生細菌の生態とそれをとりまく細菌叢を解明し、ノリ養殖環境下におけるノリおよび現場細菌群集の共存機構に関する理解の深化を図ることを目的とする。本研究では、2年間にわたり、ノリ養殖環境の海水およびノリにおける細菌叢を培養法および非培養法により調べ、優占菌種の変動と普遍的に存在する細菌群を明らかにした。さらに、ノリと養殖海域から採取した海水を室内で共培養することで、スサビノリと共存する細菌群を見出すことに成功した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate the ecology of *Pyropia yezoensis*-symbiotic bacteria and the bacterial communities in aquaculture environments of *P. yezoensis*, and to understand the coexistence mechanism between *P. yezoensis* and bacterial communities in the aquaculture environments. In this study, we revealed the changes of predominant bacterial communities and the presence of ubiquitous bacteria in samples of seawater and *P. yezoensis* over two years, using culture and DNA/RNA clone library methods. Furthermore, co-cultivation of *P. yezoensis* and aquaculture seawater in laboratory experiments provided the information on the bacterial communities closely associated with *P. yezoensis*.

研究分野：環境微生物学

キーワード：スサビノリ 共生細菌 細菌叢 ノリ養殖環境 共存機構

1. 研究開始当初の背景

(1)日本のノリ養殖の現状

日本におけるノリ養殖は、我が国の主要養殖業の一つに位置づけられる。日本のノリ養殖は、水温が23℃を下回る冬季に行われるが、近年、ノリ養殖環境の悪化が問題となり、ノリ養殖生産量は減少傾向にある。その原因としては、地球温暖化の進行によるノリ生産期間の短縮、栄養塩の低下による色落ち、漁期中の病害の多発等が挙げられ、生産現場において深刻な問題となっている。さらに、輸入の増大と消費の伸び悩みによる価格低迷も相まって、我が国のノリ養殖は非常に厳しい状況に置かれているのが現状である。このような状況の下で、日本のノリ養殖業を発展させていくためには、高生長・高品質のノリを育成することを目的とした研究開発の推進が喫緊の課題である。

(2)スサビノリ室内培養系における共生細菌の発見

スサビノリ海産大型藻類と細菌の間には密接な関係性がある。例えばある種の細菌は、大型藻類の発育に多大な影響を及ぼすことが知られている (Singh and Reddy, 2014)。しかし、日本の最重要養殖品種の一つであるスサビノリにおいて、どのような種類の細菌がノリの発育促進に関与しているかは明らかにされていない。そこで、スサビノリの発育促進細菌のスクリーニングを目的とし、次の試験を行った。スサビノリ室内培養系から分離・培養した菌株のスサビノリ・無菌プロトプラストへの添加試験の結果、 α -プロテオバクテリアの *Hyphomonas* sp. の菌株が、スサビノリの正常な形態形成を有意に促進することを明らかにした (Fukui et al., 2014)。これらの結果から、*Hyphomonas* 属細菌はスサビノリの発育促進に関与し、両者間には何らかの共生関係が介在するとの作業仮説を得るに至った。

(3)スサビノリ養殖環境における細菌の生態

スサビノリ共生細菌 *Hyphomonas* sp. の菌株は、室内で馴化させたスサビノリの培養系から分離された。この細菌が、実際のノリ養殖環境において、いつ、どこで、どれくらい生息しているかは不明であり、その定着性・普遍性に関する情報は皆無である。共生細菌がノリの生育に与える影響の大きさに鑑みれば、ノリ養殖環境下における細菌の生態、多様性、ならびに分類を解明することは、きわめて重要である。これまでの研究で、スサビノリの室内培養系から多くの新種細菌を発見しているが、実養殖環境中に存在する細菌群はより多様であり、宿主であるノリとともにきわめて複雑なネットワークを形成していると予想される。

2. 研究の目的

これまでに、重要養殖対象種であるスサビ

ノリの室内培養系中に共生細菌が存在することを明らかにした。これらの共生細菌は、藻体の形態形成や発育促進に重要な影響を与えることが解明されつつある。しかしながら、これらの共生細菌が実際のノリ養殖環境中でどのような挙動を示すかは一切明らかにされていない。そこで本課題では、ノリ養殖環境における共生細菌の生態を解明するとともに、それをとりまく環境要因および細菌叢との関連を明らかにすることを目的とした。さらに、ノリが天然の細菌叢に与える影響を室内実験系で評価することで、ノリ養殖環境下におけるノリおよび現場細菌群集の共存機構に関する理解の深化を図ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)スサビノリ共生細菌の養殖環境下における生態調査

ノリ養殖環境におけるスサビノリ共生細菌 *Hyphomonas* sp. の菌株を対象とした定量的調査の前段階として、本菌に特異的な定量PCR法を開発した。本菌のドラフトゲノム配列からハウスキーピング遺伝子塩基配列を抽出し、標準株の既知配列と比較し、特異性の高い領域にプライマーおよびプローブを設計した。本定量PCR法の特異性を評価し、天然試料中の共生細菌の定量に適用した。

2年間にわたり、ノリの養殖時期 (10月/11月~3月) に1ヶ月に一度、ノリ養殖場から育苗ノリと海水を経時的に採取した。また、ノリ養殖環境における海水の環境因子 (水温、塩分、pH、溶存酸素濃度) を測定した。採取した海水および育苗ノリの試料調製を行い、これらの試料を0.20 μm のフィルターで濾過し、市販のキットによりDNAおよびRNAを抽出した。この抽出DNAを定量PCRの鋳型として用い、既知の菌数の検量線から、実際にノリ養殖環境から採取した育苗ノリと海水における共生細菌の菌数を測定した。

(2)スサビノリ養殖環境における細菌叢解析

ノリ養殖環境において、どのような種類の細菌が、育苗ノリ表面 (付着画分) および海水 (浮遊画分) に存在・優占し、いつの時期に観察されるかを、3つの手法で調べた。培養法では、海洋細菌を分離するためにマリンアガー培地を用い、生菌数を測定した。そして、分離菌株については16S rRNA 遺伝子塩基配列の前半領域を決定することにより同定した。また、上記で抽出したDNAおよびRNAを用いて、培養を行うことなく16S rRNA 遺伝子の塩基配列により細菌種を同定する16S rRNA 遺伝子ライブラリー (DNAライブラリー) を構築した。さらに、ノリの試料においては代謝活性の強い細菌種を見出すことを目的とし、RNAを抽出後、cDNAに逆転写することで、16S rRNA ライブラリー (RNAライブラリー) を作製した。

(3)スサビノリと細菌群の共存機構の解明

ノリは共存する細菌叢に選択的な影響を与え、その結果としてノリ養殖場において特徴的な細菌叢が形成されていると考えられる。そこで、スサビノリと細菌群の共存機構を理解することを目的とし、この仮説に対する実証試験を環境要因に依存しない室内閉鎖系で評価した。

ノリ養殖場から育苗ノリと海水を採取するとともに、ノリ養殖環境とは異なる海域の海水を採取した。これらの海水試料に、ノリの抽出液および表面をクエン酸で殺菌したノリ葉体をそれぞれ添加した後、室内培養を行い、培養前後の細菌叢の変化を 16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析により調べた。

4. 研究成果

(1)スサビノリ共生細菌の養殖環境下における生態調査

最初に、スサビノリの共生細菌 *Hyphomonas* sp. 菌株に特異的な定量 PCR 法を開発した。スサビノリ共生細菌の 16S rRNA 遺伝子の全長配列は、*H. atlantica* LMG 27916^T 株と高い相同性を示したことから、本菌は *H. atlantica* の細菌種であると同定された。次に、ノリの共生細菌のドラフトゲノム配列から *gyrB* 遺伝子塩基配列を探索し、*Hyphomonas* 属の標準株の既知配列と比較し、特異性の高い領域にプライマーおよびプローブを設計した。これらのプライマーおよびプローブについて、*Hyphomonas* 属細菌の標準株を用いて特異性評価を行ったところ、ノリ共生細菌 (*H. atlantica*) を定量・検出できる条件を見出した。

次に、この特異検出定量 PCR 法を用いて、ノリ養殖環境の育苗ノリおよび海水における菌数を経時的に調べた。その結果、共生細菌は、海水および育苗ノリ試料ともに検出限界以下であったが、養殖初期のノリの幼葉状態が付着したノリ網からは少量の菌数が検出された。しかしながら、ノリの共生細菌が検出された試料が少なかったため、環境要因との関連を調べるには至らなかった。これらの結果から、本研究で調査したノリ養殖場における共生細菌の菌数は少なく、その分布は限られていることが推察された。今後、ノリの部位別や発育段階に応じて調査することや複数のノリ養殖場を対象とし、地理的な分布を調べる必要がある。

(2) ノリ養殖環境におけるノリ表面および海水の細菌数

ノリ養殖場から採取したノリおよび海水における生菌数および総菌数を調べた。ノリの生菌数は $10^5 \sim 10^7$ CFU/wet g、総菌数は $10^7 \sim 10^8$ cells/wet g で、培養可能率は 0.2 ~ 15.4 % を示し、特に冬季の試料で培養可能率は低くなった。海水の生菌数は $10^3 \sim 10^5$ CFU/ml、総菌数は $10^6 \sim 10^7$ cells/ml で、培養可能率は 0.1 ~ 3.7 % を示した。このように、ノリの養殖環境に存在する細菌のなかには未培養のもの

が多いことが示唆された。

(3) スサビノリ養殖環境における細菌叢解析
2 年間のノリの養殖時期に、スサビノリの養殖環境から育苗ノリと海水を経時的に採取し、培養法と非培養の DNA および RNA クローンライブラリー法により、16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づいた細菌叢解析を行った。

ノリ表面および海水の優占菌群

育苗ノリ表面の細菌叢について、培養法では、 α -プロテオバクテリアの Rhodobacteraceae 科、Erythrobacteraceae 科、および CFB グループの Flavobacteriaceae 科の細菌が時期により優占して分離された。DNA および RNA の両ライブラリー法では、Rhodobacteraceae 科、Flavobacteriaceae 科、もしくは γ -プロテオバクテリアの Granulosicoccaceae 科が優占する傾向にあった。この中で、Flavobacteriaceae 科の細菌は、冬季の一部の試料ではほぼ全てのライブラリーを占めることがあった。また、非培養法で優占して検出された Granulosicoccaceae 科は、培養法では分離されなかった。

ノリ養殖場の海水からは、培養法では α -プロテオバクテリアが 60 % 以上を占め、その中で Rhodobacteraceae 科が優占菌として分離された。DNA ライブラリーにおいては、 α -プロテオバクテリアの Rhodobacteraceae 科もしくは SAR11 が優占する傾向にあった。これらの結果から、同じノリ養殖環境下において、海水で分離・検出された優占細菌とノリ表面で優占した細菌群は異なることが示唆された。

養殖期間を通して分離・検出された細菌群

養殖期間を通して、ノリの表面から分離された菌群は、Rhodobacteraceae 科および Flavobacteriaceae 科であった。DNA および RNA クローンにおいて、ノリの表面からは Flavobacteriaceae 科が全期間で検出され、次いで Rhodobacteraceae 科が多く期間で見出された。また、RNA クローンでは Granulosicoccaceae 科が多く期間から検出された。

海水からは、Rhodobacteraceae 科および Flavobacteriaceae 科の細菌が全養殖期間から分離された。一方、DNA クローンでは、 γ -プロテオバクテリアの未分類の菌群が全期間の海水から検出され、次いで Rhodobacteraceae 科、SAR11、および γ -プロテオバクテリアの Alteromonadaceae 科がほぼ全ての期間で検出された。

ノリ養殖環境における細菌群の多様性解析

海水およびノリ表面の試料の DNA ライブラリーについて、多様性指標値 (Shannon、Simpson、および Chao1) を比較した結果、ノリ表面の細菌群の多様性は、海水の細菌群に比べて低い値を示す傾向にあった。従って、

ノリ表面に存在する細菌群は選択されている可能性が示唆された。さらに、ノリの表面から分離された菌株およびクローンの中には、既知の細菌の塩基配列と比較して、相同性の低いものが多く含まれたことから、ノリの表面には独特な細菌叢が形成されていることが示唆された。

(4) スサビノリと細菌群の共存機構の解明

最初に、各海域から採取した海水および育苗ノリの細菌叢を 16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析により調べた。両海水試料においては CFB グループ、 α -プロテオバクテリア、および γ -プロテオバクテリアが優占し、育苗ノリの表面では CFB グループが最も優占し、その割合は海水に比べて高かった。

次に、これらの海水試料を室内培養に移し、ノリの抽出液および表面を殺菌したノリを添加して培養を行った後、細菌叢の変化を調べた。その結果、ノリの抽出液を両海域の海水に添加した区において、培養後の海水の優占菌群は γ -プロテオバクテリアに変化した。また、殺菌したノリをノリ養殖場の海水で培養したとき、海水では γ -プロテオバクテリアが優占したのに対して、ノリ表面では CFB グループの Flavobacteriaceae 科が優占する傾向にあった。一方、ノリを養殖環境とは異なる海域の海水で培養したとき、海水およびノリ表面において γ -プロテオバクテリアが優占し、CFB グループは低い割合を示した。これらの結果から、育苗ノリの表面に優占する CFB グループは、ノリ養殖場の海水からノリ葉体自体の影響を受け、選択されることが推察された。

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)

1. Fukui Y, Abe M, Kobayashi M, Satomi M. (2015). *Sulfitobacter pacificus* sp. nov., isolated from the red alga *Pyropia yezoensis*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 107:1155–1163 (査読有).

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 福井洋平、島田裕至、スサビノリ養殖環境における細菌叢解析、第 20 回マリンバイオテクノロジー学会、2018 年 5 月 26-27 日、フェニックス・シーガイア・リゾート(宮崎県宮崎市)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

福井 洋平 (FUKUI YOUHEI)

国立研究開発法人水産研究・教育機構

中央水産研究所・研究員

研究者番号: 40565561

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()