

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15739

研究課題名(和文) サンゴ常在菌が産生するサンゴ菌叢維持分子Homeostaticsの同定

研究課題名(英文) Identification of the molecules "Homeostatics" that maintain the coral microbial flora produced by coral-associated bacteria

研究代表者

三浦 夏子(Miura, Natsuko)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教

研究者番号：80724559

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)：小型分離共培養容器を用いてRuegeria属細菌と*V. coralliilyticus*の菌種間相互作用を実験的に再構築し、菌種間相互作用がみられる共培養条件を決定した。また、培養液上清を分画・精製し、MALDI-MSおよびLC-MS/MSを用いて菌種間ではたらく候補分子を決定した。さらに、In silico PCR等を用いて混合培養時あるいは実環境中において、Ruegeria属細菌特異な検出用プローブを開発し、フィールドにおけるサンゴ共生細菌の分布調査を行うとともに、造礁サンゴの一種である*G. fascicularis*に共生するRuegeria属細菌を含む細菌株を新たに複数単離・寄託した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では共培養容器を用いて、特定の物質を介した2種の細菌間相互作用が実験的に再構築可能であることを示し、各種菌種間相互作用の解明に向けて新たなアプローチを提唱した。また、これまでサンゴ微生物叢における機能がほぼ未解明であったRuegeria属細菌のサンゴ病原菌に対する効果を検証することで、本菌並びに本菌が産生する生理活性物質の利用可能性を示した。さらに、本研究により、これまで入手が非常に困難であったRuegeria属細菌を含む複数のサンゴ共生細菌を研究者が自由に入手・使用することが可能となった。こうした成果は、国際的なサンゴ共生微生物研究の推進に貢献することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Using a small scale co-culture vessel, the inter-species interaction between *Ruegeria* spp. and *V. coralliilyticus* was experimentally reconstructed, and the co-culture conditions in which the inter-species interaction was observed were determined. The culture supernatant was fractionated and purified, and candidate molecules that worked between bacterial species were determined using MALDI-MS and LC-MS/MS. Furthermore, using in silico PCR, etc., we developed several probes for specific detection of *Ruegeria* spp. in field or mixed culture. In addition, several new bacterial strains containing *Ruegeria* spp. coexisting with *G. fascicularis* were isolated and deposited.

研究分野：応用微生物学

キーワード：サンゴ共生細菌 分離共培養 Ruegeria属細菌 環境DNA

1. 研究開始当初の背景

サンゴ礁を構成する造礁サンゴは、生物多様性の維持や海洋資源の保全に貢献する重要な生物種である。しかし近年、地球温暖化に伴う諸要因により、沖縄を含む主だったサンゴ礁域で大規模なサンゴ斃死が観察されてきた。サンゴの大量死はサンゴの遺伝的多様性の消失を引き起こす。遺伝的多様性の低いサンゴ集団は、病原菌の大流行を誘発し、早期に絶滅の危機を迎える可能性がある。

サンゴ病原菌である *Vibrio coralliilyticus* は、プロテアーゼを産生してサンゴを障害することが知られている [Santos et al. 2011 *ISME J*]。2016 年、サンゴ常在菌の中に、病原菌である *V. coralliilyticus* からサンゴを守るはたらきのある細菌が含まれる可能性が示唆された [Bourne et al. *Annu Rev Microbiol*]。申請者らは 2017 年にサンゴ常在菌の中から病原菌の生育阻止活性を持つ複数の新規 *Ruegeria* 属細菌の単離に成功した [Miura et al. 2018 *Marine Biotechnol*]。こうした *Ruegeria* 属細菌は、生育阻止活性物質単体での利用に加えて、菌自体もプロバイオティクスとして使用可能であると考えられる。サンゴ保護に向けたプロバイオティクスの実用化に向けては、*Ruegeria* 属細菌がどのような機序で抗病原菌活性を発揮するのかを明らかにすることが重要である。

2. 研究の目的

本研究では、*Ruegeria* 属細菌と *V. coralliilyticus* の菌種間相互作用に関与する物質群を“Homeostatics”と名付け、各種 Homeostatics の同定を通して *V. coralliilyticus* の病原性発揮に至るメカニズムと *Ruegeria* 属細菌の寄与を解明することで、サンゴ常在菌叢における恒常性維持機構を解明することを目指した。

3. 研究の方法

試験管内における菌種間相互作用の検証および相互作用物質の同定

小型分離共培養容器 (サンキ精機社製) を用いて *Ruegeria* 属細菌と *V. coralliilyticus* の菌種間相互作用を実験的に再構築し、菌種間相互作用がみられる共培養条件を決定した。また、決定した条件において菌種間ではたらく分子について、培養液上清を分画・精製し、MALDI-MS および LC-MS/MS により候補分子を決定した。

Ruegeria 属細菌特異的な検出手法の確立

混合培養時あるいは実環境中において、*Ruegeria* 属細菌を特異的に検出できるプローブを開発した。具体的には *In silico* PCR 等を用いて環境 DNA から効率的に *Ruegeria* 属細菌由来 DNA 断片を検出可能なリアルタイム PCR・コロニー-PCR 用のプローブをライブラリから構築・自動選抜した。また、サンゴ礁域の海水から環境 DNA を抽出し、*Ruegeria* 属細菌をはじめとしたサンゴ共在細菌の分布を検証する手法について検討した。

4. 研究成果

菌種間相互作用物質の検出および同定

V. coralliilyticus に対して生育阻止活性をもつ *Ruegeria* 属細菌株の培養液上清から各種カラムを用いて抗菌活性のある画分を精製し、続く SDS-PAGE により確認できたバンドについて MALDI-MS および LC-MS/MS により同定を試みた。その結果、*Ruegeria* 属細菌に由来すると考えられる複数の候補タンパク質配列が推定できた。また、小型分離共培養容器を用いて異なる存在割合における各菌の生育を調べたところ、予想外に、*V. coralliilyticus* と *Ruegeria* 属細菌の相互作用に関わる新たな現象を見出した。現在、この新規現象に関わる原因分子について解析を進めているところである。

サンゴ共在細菌 *Ruegeria* 属細菌の調査手法確立および新規なサンゴ共在細菌株の取得ならびに寄託

In silico PCR 等を用いて、*Ruegeria* 属細菌を混合培養時やフィールドでも検出可能とするための新規プローブを開発した (Kitamura and Miura et al. 2020 *Biosci Biotechnol Biochem*)。作成した *Ruegeria* 属細菌特異的なプローブ設計をさらに展開し、サンゴ病原菌である *V. coralliilyticus* に対して生育阻止活性を持つ *Ruegeria* 属細菌の分布調査方法について検討を

行った。その過程で設計した新たなプローブや、環境 DNA の解析手法等をまとめ、沖縄の瀬底島周辺におけるサンゴ共生細菌の分布調査結果について投稿中である (Kitamura and Miura et al.)。また同時に、造礁サンゴの一種である *Galaxea fascicularis* に共生する *Ruegeria* 属細菌を含む細菌株を新たに複数単離し、順次公的機関への寄託手続きを進めている。これにより、フィールドやサンゴ共生時における *Ruegeria* 属細菌の動態を検証することが可能になった。また、これまで入手が非常に困難であった *Ruegeria* 属細菌を含むサンゴ共生細菌を研究者が自由に入手・使用することが可能となり、国際的なサンゴ共生微生物研究の推進に貢献することが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kitamura Ruriko, Miura Natsuko, Okada Keiko, Motone Keisuke, Takagi Toshiyuki, Ueda Mitsuyoshi, Kataoka Michihiko	4. 巻 84
2. 論文標題 Design of novel primer sets for easy detection of <i>Ruegeria</i> species from seawater	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 854 ~ 864
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2019.1700776	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Natsuko Miura, Keiko Okada, Keisuke Motone, Toshiyuki Takagi, Mitsuyoshi Ueda, Michihiko Kataoka
2. 発表標題 Features of antibiotic activity against <i>Vibrio coralliilyticus</i> by coral-associated <i>Ruegeria</i> sp.
3. 学会等名 Joint Conference of the 12th International Marine Biotechnology Conference and the 12th Asia Pacific Marine Biotechnology Conference（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北村瑠璃子, 三浦夏子, 岡田圭以子, 元根啓佑, 高木俊幸, 植田充美, 片岡道彦
2. 発表標題 <i>Ruegeria</i> 属細菌の分布調査を目的とした環境DNA検出法の検討
3. 学会等名 2019年度西日本・中四国支部合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北村瑠璃子, 三浦夏子, 岡田圭以子, 元根啓佑, 高木俊幸, 植田充美, 片岡道彦
2. 発表標題 <i>Ruegeria</i> 属細菌の分布調査を目的とした環境DNA検出法の検討
3. 学会等名 第2回環境DNA学会神戸大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西川有美, 三浦夏子, 植田充美, 片岡道彦
2. 発表標題 分離共培養容器を用いたサンゴ共生細菌間相互作用の実験的再構築
3. 学会等名 2020年度農芸化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北村瑠璃子, 西川有美, 西村優菜, 三浦夏子, 伊藤通浩, 高木俊幸, 片岡道彦
2. 発表標題 沖縄のサンゴ礁海域におけるRuegeria属細菌分布調査の検討
3. 学会等名 2020年度農芸化学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関