

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03118

研究課題名(和文) 海藻の生育を支える海藻-微生物相互作用の全体像の解明

研究課題名(英文) Exploration of the overall picture of seaweed-microbe interaction that support seaweed growth

研究代表者

伊藤 通浩 (Ito, Michihiro)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・助教

研究者番号：80711473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、海藻の生育を共存微生物がどのように支えているのかを、沖縄県の主要水産物であるオキナワモズク(以下モズク)を用いて解明することを目的とした。本研究から、モズク細菌叢は1)周辺海水のもととは全く異なるモズクに特徴的な細菌叢であること、2)モズクの生育地点ごとに類似していること、3)モズクの成長につれて変動すること、が明らかになるとともに、4)モズクの細胞壁成分であるフコイダンを分解する菌を含むこと、5)モズクが生合成できないと考えられる重要な栄養素をモズクに供給することが示唆された。以上から、モズク細菌叢は、モズクの生育に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

モズクは南西諸島において古くから食用とされ、現在では沖縄県の養殖生産額第1位となっている重要水産資源である。一方で、モズクの年間生産量は不安定であり、たびたび不作に見舞われている。本研究で得たモズク細菌叢とモズクの相互作用に関する知見は、モズク共存微生物を利活用してモズクの生産安定化を実現しようとする新規の海藻養殖技術の開発に繋がる可能性があり、社会的意義はきわめて大きい。実際に、本研究課題の代表者らは、本研究の成果を基盤として、モズク共存微生物をモズク養殖に活用する新規研究開発プロジェクトをスタートさせることができた(採択済み)。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to elucidate how bacteria inhabiting seaweeds support the growth of their hosts using Okinawa mozuku (*Cladosiphon okamuranus* Tokida), a major aquaculture product of Okinawa prefecture, Japan. This study revealed that the mozuku bacterial flora 1) is characteristic of mozoku, which is totally different from its surrounding seawater, 2) is similar at mozuku growing site, 3) changes as the mozuku grows, and also suggested 4) that the mozuku bacterial flora contains bacteria degrading fucoidan, a major component of mozuku cell wall, and 5) that it supplies important nutrients that mozuku is unable to produce to mozuku. These results suggest that the mozuku bacterial flora plays an important role in the growth of mozuku.

研究分野：環境微生物学

キーワード：オキナワモズク モズク モズク細菌叢 細胞壁 フコイダン メタボローム 海藻-微生物相互作用

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

海藻は沿岸海域における主要な一次生産者であるとともに、一部は食用および機能性成分の原料となり、バイオ燃料の資源としても注目される重要な生物群である。近年、緑藻や褐藻の形態形成に共存細菌が必須であるなど、海藻の生育への共存微生物の際立つ重要性が明らかとなってきた (Singh et al. 2011; Tapia et al. 2013)。一方、海藻と共存微生物の相互作用の分子機構はほとんど未解明であった。

オキナワモズク(以下モズク)は沖縄県の基幹水産物であり、健康志向から需要が年々高まっている。その一方で、モズクの生産量は年変動が大きく、近年も不作年が頻発している。この原因は不明であり、モズクの安定生産への道は見通せない状況である。モズクの生育にも共存微生物が重要であると考えられるが、モズク共存微生物に関する知見は本研究開始前には皆無であった。モズク共存微生物の生態と機能の理解は、微生物の利用・制御の工程を含む新規養殖技術への道を拓くと考えられる。困難の真っ只中にあるモズク養殖の現状を打開するきっかけとなる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究は、海藻の生育を共存微生物がどのように支えているのかを、褐藻の一種オキナワモズク *Cladosiphon okamuranus* Tokida (以下モズクと記載) を対象として解明することを目的とした。このために、本研究では、微生物叢の群集構造、微生物叢の機能、モズクの遺伝子発現、モズクの生体成分(細胞壁多糖および有機酸等)に着目し、多角的にモズクとモズク微生物叢の相互作用を検討することとした。

3. 研究の方法

本研究では、モズク細菌叢の群集構造と機能、細菌叢の宿主であるモズクの遺伝子発現、モズクの生体成分を、天然漁場で採取したオキナワモズクを用いて解析した。モズクからのメタゲノム DNA および RNA の抽出は、本研究において新規に構築した手法を用いて行った。モズク細菌叢の群集構造と機能の解析は、それぞれ MiSeq シーケンサーを用いたメタ 16S 解析およびショットガンメタゲノム解析により行った。モズクの遺伝子発現解析は次世代シーケンサーを用いた RNAseq 法により行った。モズクの細胞壁多糖の解析では、高速液体クロマトグラフィーを用いてフコイダン等、アルギン酸等の種類別に定量分析を行った。モズクの水溶性成分の分析は液体クロマトグラフィー質量分析計を用いたノンターゲット分析により実施した。

4. 研究成果

(1) モズク細菌叢の群集構造

本研究以前にはモズク細菌叢の解析例は皆無であったため、その解析法の新規構築を最初に行った。具体的には、i) モズクからの高収率メタゲノム DNA 抽出法の確立、ii) モズク細菌叢解析に適した新規 16S rRNA 遺伝子プライマーの構築、を行った。i) では、市販の植物用 DNA 抽出キットと比較し約4倍ものモズク DNA 収量を得られ、ワカメ、コンブ等の他の褐藻にも効果の高い新規 DNA 抽出法を構築できた。ii) では、モズクのショットガンメタゲノムデータと高い相関を示すモズク細菌叢群集構造データを得られる新規プライマーを構築できた。

次に、構築した方法を用いて、沖縄県内の産地別・時点別のモズク細菌叢の比較解析を行った。沖縄県内8地点から採取したモズクおよびモズク周辺海水の細菌叢を解析した結果、i) モズクとその周辺海水の細菌叢は明確に異なっており、モズクにはモズクの細菌叢が形成されていること、ii) モズク細菌叢には産地ごとの特徴があること、および iii) 全てのモズク試料に共通して存在する普遍的な細菌種が存在することを見出した。本菌種はモズクと密接な関係を有する可能性があり、きわめて興味深い。

さらに、沖縄県本部町備瀬のモズク漁場において、漁業者の協力のもと、モズク細菌叢を時系列で追跡する野外実験を行った。本漁場内に、養殖網に最終的に生育するモズクの総量(収量)が比較的大きくなることが知られている苗床Gと、苗床Gからわずか数十mしか離れていないにも関わらず、収量が比較的小さくなることが知られている苗床P (Sato Y, Nagoe H, Ito M et al. Phycological Res (2021) 69:159-165) がある(図1)。これらの2地点に、本研究用のモズク網を設置し、モズク細菌叢を解析した結果、i) モズクの採取時期によりモズク細菌叢に大きな差異が見出されること、ii) 年によって苗床Pと苗床Gの間でモズク細菌叢に差異が見られること、の2点が明らかとなった。苗床PとGのモズク細菌叢の差異の要因として、両苗床間の環境の違いと、モ



図 1. 沖縄県本部町備瀬の地先に設置した実験フィールド。苗床 G と苗床 P は数十 m の距離に位置する。

ズクの状態の違いの2つが考えられた。

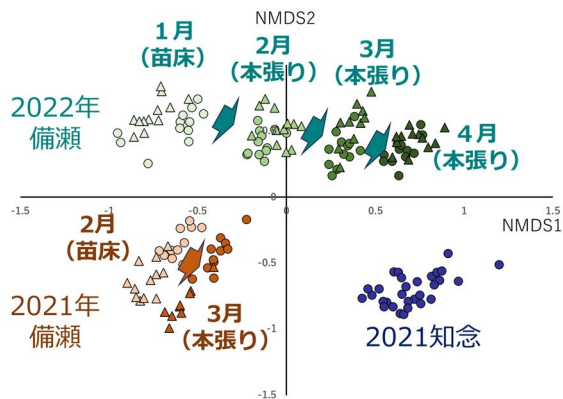


図 2 モズク細菌叢の群集構造の変遷. 細菌叢データを非計量多次元尺度法により二次元配置した. 2021年と2022年の調査結果を表示した. 備瀬のデータにおいて、○と△はそれぞれ苗床Gおよび苗床Pで生育したモズクを示す. 2022年では苗床間で差異が見られないが、2021年では苗床間でモズク細菌叢に差異がみられた.

適用できないことが判明した。そこで、本研究においてモズクRNAの抽出法の改良に着手し、網羅的遺伝子発現解析に適用可能なモズクからの新規RNA抽出法を確立することができた。

次に、2021年と2022年の2か年にわたって採取した上記苗床Gと苗床P(図1)由来のモズク試料のRNAseq解析を行った結果、両苗床でモズクの遺伝子発現パターンが2か年も異なっていた。具体的には、苗床Pでは苗床Gと比較してストレス応答に関する遺伝子の発現が2か年続けて多く検出された。一方で、苗床Pで発現が上昇していた遺伝子は2か年で異なっていた。

(4) モズクの生体成分

モズク藻体の生体成分として、細胞壁多糖と水溶性成分に着目して解析を行った。細胞壁を分画して画分ごとに細胞壁多糖の組成解析を行った結果、画分ごとにフコイダンの構造が異なっており、セルロースとのクロスリンクによる細胞壁構造の強化に特定の構造のフコイダンが関与していることが示唆された。また、モズクは粘性や食感が収穫時期により異なることが知られていたが、本研究から、収穫時期により細胞壁多糖の成分が変化し、それに伴って藻体の硬さが変化することが判明した。早期に収穫する「早摘みモズク」と「完熟モズク」では、セルロースとクロスリンクして細胞壁を強化するフコイダンは後者に豊富であり、このことが後者の藻体の硬さ・強度に寄与していると考えられた。

モズク藻体の水溶性成分は、苗床Gおよび苗床P(図1)のどちらか一方を経て「本張り」に移設されたモズクを用いてメタボローム解析した。その結果、「本張り」に移設されて一か月以上を経ているにもかかわらず、苗床Gと苗床Pのどちらを経ているかでメタボロームのプロファイルが異なっていた。すなわち、モズクのメタボロームは藻体長が数cmの“幼少期”の生育環境の影響が、藻体長20cm以上の“大人”になっても残存することが判明した。

(5) まとめ

本研究では、モズク細菌叢の群集構造、モズク細菌叢の機能、モズクの遺伝子発現、およびモズクの生体成分を、モズクの生育地点と生育段階に着目して解析した。その結果、モズクは生育地点および生育段階で、細菌叢と藻体の状態(遺伝子発現および生体成分)の双方に差異があることが明らかとなった。このことは、モズクが、生育環境に応じて、また自身の生育段階に応じて、多様にかつ柔軟に環境に適応する能力があることを示している。この中で、モズク細菌叢はモズクに様々な働きかけを行っている可能性が示唆された。特に、モズクの成長に重要な栄養素をモズク細菌叢が補完する可能性は、今後のモズク共存細菌の利活用に繋がる重要な知見である。実際に、我々は、本研究を経て、モズク共存細菌をモズク養殖に活用する新規研究を開始した。以上、本研究において、モズク細菌叢とモズクの相互作用および環境適応について、学術的に意義があり、かつ応用研究の基盤となる知見を得ることができた。

(2) モズク細菌叢の機能

(1)で確立したDNA抽出法により得たモズクメタゲノムを用いて、モズク細菌叢の機能解明を目的としたショットガンメタゲノム解析を実施し、i) モズク細菌叢がモズクに有益な栄養源をモズク藻体に供給している可能性、およびii) モズク細菌叢にモズクが特に多く生産することが知られている難分解性多糖フコイダンの分解菌が含まれることの、2点を示唆するデータを得た。i)より、モズクの生育へモズク細菌叢の具体的な寄与の在り方が実データより示唆された点は、モズク共存微生物のモズク養殖への有効利用に向けて意義が大きい。

(3) モズクの遺伝子発現

モズクのRNAseq解析には十分な量と質のRNAが抽出できることが必須であるが、市販キットの標準プロトコルでモズクRNAの抽出を試みた結果、収量がきわめて低く、当該プロトコルはモズクに

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tozaki Kandai, Nishihara Gregory N., Kawate Azusa, Konishi Teruko, Sato Yoichi, Ito Michihiro, Fujimura Hiroyuki, Tanaka Atsuko	4. 巻 72
2. 論文標題 Vegetation variety affected by local environments in a coral reef lagoon	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Phycological Research	6. 最初と最後の頁 112 ~ 122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pre.12540	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 -
1. 著者名 Miwa Yuka, Awanthi Mahanama Geegana Gamage, Soga Kouichi, Tanaka Atsuko, Ito Michihiro, Numata Yuichiro, Sato Yoichi, Konishi Teruko	4. 巻 12
2. 論文標題 The Cell Wall Characterization of Brown Alga Cladosiphon okamuranus during Growth	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 3274 ~ 3274
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/plants12183274	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Awanthi Mahanama Geegana Gamage, Nakasone Natsuki, Oku Hirotsuke, Kitahara Kanefumi, Ito Michihiro, Tanaka Atsuko, Sato Yoichi, Numata Yuichiro, Konishi Teruko	4. 巻 72
2. 論文標題 Characterization of cell wall polysaccharide from Cladosiphon okamuranus cultivated in different locations	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Phycological Research	6. 最初と最後の頁 3 ~ 11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pre.12531	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 -
1. 著者名 Awanthi Mahanama Geegana Gamage, Umosa Manatsu, Yuguchi Yoshiaki, Oku Hirotsuke, Kitahara Kanefumi, Ito Michihiro, Tanaka Atsuko, Konishi Teruko	4. 巻 523
2. 論文標題 Fractionation and characterization of cell wall polysaccharides from the brown alga Cladosiphon okamuranus	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Carbohydrate Research	6. 最初と最後の頁 108722 ~ 108722
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.carres.2022.108722	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 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三輪優香、田中厚子、沼田雄一郎、佐藤陽一、小西照子
2. 発表標題 褐藻類オキナワモズク (<i>Cladosiphon okamuranus</i>) 由来細胞壁の構造解析
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤通浩、宇江城蘭、新里尚也、田中厚子
2. 発表標題 オキナワモズク細菌叢の産地別・時点別比較解析
3. 学会等名 日本微生物生態学会第34回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 徳浜すみれ、藤村 弘行、田中厚子、佐藤陽一、伊藤通浩、小西照子、Gregory N.Nishihara
2. 発表標題 備瀬崎海域における硫化水素と栄養塩の動態
3. 学会等名 日本サンゴ礁学会第24回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤通浩
2. 発表標題 オキナワモズク細菌叢の機能解明と利活用を目指して
3. 学会等名 日本藻類学会第48回大会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 小西照子
2. 発表標題 オキナワモズクの細胞壁多糖
3. 学会等名 日本藻類学会第48回大会（招待講演）
4. 発表年 2024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
研究分担者	小西 照子 (Konishi Teruko) (30433098)	琉球大学・農学部・教授 (18001)	
研究分担者	田中 厚子 (Tanaka Atsuko) (40509999)	琉球大学・理学部・准教授 (18001)	
研究分担者	岩崎 公典 (Iwasaki Hironori) (50347134)	琉球大学・熱帯生物圏研究センター・准教授 (18001)	

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
---------	---------