

研究終了報告書

「エコプロバイオティクスによる環境適応型サンゴの創出」

研究期間：2020年12月～2023年3月

研究者：高木 俊幸

1. 研究のねらい

サンゴ礁は全海洋生物種の約25%に生態系サービスを提供しており、生息する生物の多様性は、陸上の熱帯雨林に匹敵する。サンゴ礁の中核を担うサンゴは、その礁構造が物理的な棲み場所を形成しているだけでなく、体外に分泌した粘液がプランクトンや魚類に餌として利用されるなど、食物網の観点からも生態系に必要不可欠な動物である。またサンゴは体内・体表に褐虫藻や細菌などの様々な微生物を共生させてマイクロな生態系も構築しており、多様な生物がまるで一つの生命体のように振る舞う「ホロビオント」と表現される複合共生系を作り出している。近年、サンゴの体内から共生する褐虫藻が消失する白化現象が頻発し、1990年代以降世界のサンゴ礁の約30%が消滅した。大規模な白化現象が最初に報告されてから20年以上経過するにも関わらず、いまだに有効な解決策は見出されておらず、今まさに取り組むべき喫緊の環境問題である。

これまでに高木らは、白化の原因となる褐虫藻への強光や高温ストレスを緩和するカロテノイド生産菌(Carotenoid-Producing Bacterium; CPB)の分離培養に世界で初めて成功している。CPBを用いた細菌叢操作により温暖化が進む地球環境に適応できるサンゴホロビオントを創出できれば、サンゴの遺伝的多様性を損なうことなく、短期間で環境変動や病気に強いサンゴ礁を創出できる。そこで本研究は、微生物の力により生態系を保全する「エコプロバイオティクス」の概念を提唱し、ヒトの健康維持や疾患治療を中心に展開されてきたプロバイオティクスの概念や細菌叢操作・解析技術を、環境分野の共生体であるサンゴホロビオント研究へ拡張することで、世界のサンゴ礁保全をリードする先進的な育種法を創出する。さらに、環境適合型サンゴホロビオントの分子機序を把握することは、「複合共生系の理解と制御」という新たな視点による革新的な環境保全技術の開発に繋がる可能性がある。そこで、微生物の培養技術、NGSや代謝物解析などを活用したオミクス解析、生物間相互作用を可視化するイメージング技術などの最新のバイオテクノロジーを駆使して、サンゴ-褐虫藻-細菌が作り出す複合共生系の生物間ネットワーク解明と制御技術の開発を目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

自然環境中における褐虫藻-細菌間の相互作用を明らかにするために、サンゴと共生している褐虫藻の分離培養を試みた。白化から回復後のサンゴに共生し、耐熱性を備えていることが報告されている、クレードD 褐虫藻 GFS1 株の培養に成功した。この過程で f/2+KAS プレート(Kanamycin、Ampicillin、Streptomycin を含有)において褐虫藻を処理すると、共生細菌として色素細菌が顕著に生残することを見出した。そこで、褐虫藻-色素細菌の共生関係を詳細に調査した。色素細菌は単独の状態では抗生物質耐性能を持たず、褐虫藻の細



胞表面に生息することで抗生物質から逃れて生残していることを明らかにした。

褐虫藻-色素細菌の共生関係を調べる過程で発見した Flavobacteriaceae 科 *Maribacter* 属の C-4077 株は、既存の GF1 株 (Motone et al. *mBio*, 2020) よりもゼアキサンチン合成量が高く、褐虫藻の強光ストレス緩和に有望な菌株であった。そこで、C-4077 の存在比率が 100% に上昇し、CFU カウントベースで色素細菌が約 8 倍増加した褐虫藻 KAS-4077 株を取得し、親株 NIES-4077 と強光条件における光合成能力 (F_v/F_m) を比較した。NIES-4077 の F_v/F_m は、KAS-4077 と比較して 14 日間継続して有意に減少したことから、*Maribacter* 属 C-4077 は褐虫藻の強光ストレス軽減機能を持つことが明らかとなった。

任意の CPB を褐虫藻に感染させる細菌叢操作法の開発を目指して、褐虫藻の無菌化を試みた。サンゴに共生する主要なクレード C 及びクレード D の褐虫藻に対して、約 100 日間にわたる強力な抗生物質処理を実施し、一部については無菌状態の藻体を得ることができた。さらに抗生物質処理後の褐虫藻を用いて細菌叢操作法を開発し、CPB 共生褐虫藻を創出した。次に、ストレス耐性が向上した CPB 共生褐虫藻をサンゴに取り込ませるために、メントールによるサンゴ白化誘導試験を実施した。メントールと光合成阻害剤を含む人工海水で処理することで、褐虫藻を除去した非共生状態のサンゴの作成に成功した。非共生状態のサンゴへ褐虫藻を添加したが、うまく藻体を獲得させることができなかった。現在、メントール処理とは異なる手法により CPB 共生褐虫藻をサンゴに取り込ませることに成功したため、飼育を継続して各種ストレス実験を実施している。

(2) 詳細

自然環境中における褐虫藻-細菌間の相互作用を明らかにするために、アザミサンゴと共生している褐虫藻の分離培養を試みた。アザミサンゴ組織から褐虫藻を回収し、Kanamycin、Ampicillin、Streptomycin (KAS 抗生物質) を含む f/2+KAS プレートに塗布し、50 日間培養することで、白化から回復後のサンゴに共生し、耐熱性を備えていることが報告されている、クレード D 褐虫藻 GFS1 株の培養に成功した。GFS1 を海洋細菌用マリンアガープレートに塗布したところ、ピンク色を呈する細菌のみがコロニーを形成した。DU1 株と命名した本菌は、16S rRNA 遺伝子配列の相同性検索の結果、*Roseivirga* 属細菌の *Roseivirga spongicola* UST030701-084 株と 95.5% の相同性を示した。

またサンゴから褐虫藻を分離培養する過程で、f/2+KAS プレートにおいて褐虫藻を処理すると、共生細菌として色素細菌が顕著に生残することを見出した。そこで、KAS 抗生物質処理の過程における褐虫藻-色素細菌の相互作用について追加解析を実施した。本成果は、2021 年のサイトビジットでの玉木アドバイザーとの議論の中から生まれたものである。クレード C 褐虫藻 (NIES-4077 株及び CCMP2466 株) を f/2+KAS において 50 日間抗生物質処理を実施した KAS-4077 株及び KAS-2466 株を取得した。回復培養をした後、16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンス解析により細菌叢を比較した。KAS-4077、KAS-2466 ともに色素細菌が増加傾向にあり、特に KAS-4077 においては Flavobacteriaceae 科 *Maribacter* 属細菌が 100% を占めていた。またサンゴから分離培養した褐虫藻 GFS1 は、ピンクの色素を合成する *Roseivirga* 属細菌が平均 91.5% を占めていた。これらの結果は、褐虫藻培養液の状態や褐虫藻-細菌相互作用によっても影響を受けるが、f/2+KAS プレートをを用いた抗生物質処理が、褐虫藻の細菌叢の中でも色素細菌を選択することを示している。

次に、褐虫藻-色素細菌の共生関係をより詳細に解明するために、f/2+KAS プレートでの処理後に生残した細菌を単離した。KAS-4077 からオレンジ色のコロニーを形成する *Maribacter* 属 C-4077 株、KAS-2466 から同じく *Maribacter* 属の C-2466 株、そして GFS1 からピンク色の色素を合成する *Roseivirga* 属 DU1 株を単離することに成功したため、Kanamycin、Ampicillin、Streptomycin に対する抗生物質感受性試験を実施した。抗生物質が細菌の増殖を抑制できる最小濃度 MIC 及び、完全に殺菌できる最小濃度 MBC を微量液体希釈法により決定した。全ての色素細菌は、Kanamycin に対して耐性を示した (MIC・MBC ともに $>64 \mu\text{g/mL}$)。C-4077、及び C-2466 は、Streptomycin に対して耐性を示したが (MIC・MBC ともに $>64 \mu\text{g/mL}$)、DU1 は MIC・MBC ともに $32 \mu\text{g/mL}$ であった。一方で、全ての色素細菌の Ampicillin に対する MIC・MBC は、 $8\sim 32 \mu\text{g/mL}$ であり、これは f/2+KAS に含まれる Ampicillin ($100 \mu\text{g/mL}$) よりも低濃度であった。f/2+KAS を用いた褐虫藻の処理において、色素細菌は 50 日間生残したにも関わらず、色素細菌が単独の状態では KAS 抗生物質は十分な殺菌能力があることを示していた。

Fluorescence *in situ* hybridization 法 (FISH 法)により抗生物質処理後の褐虫藻 (KAS-4077、KAS-2466、及び GFS1)における色素細菌の局在を調べたところ、色素細菌 C-4077、C-2466、及び DU1 はいずれも褐虫藻の細胞表面に局在しており、細胞表面以外では確認されなかった。また、アセトンを用いて色素細菌から抽出を行い、逆相 TLC 及びスペクトルスキャン ($300\sim 700 \text{ nm}$)により細菌が合成する色素を分析した。逆相 TLC 分析の結果、C-4077 及び C-2466 由来の色素は 2 つのスポットに分離した。またスペクトルスキャンの結果、C-4077 及び C-2466 由来の色素は、主に $400\sim 550 \text{ nm}$ の光を吸収した。ゼアキサンチン合成細菌である GF1 との比較から、C-4077 及び C-2466 の両株がゼアキサンチンを含む複数のカロテノイドを合成することが明らかとなった。DU1 からもピンク色を示す色素抽出に成功したが、色素同定には至らなかった。

さらに *Maribacter* sp. C-4077 は光を吸収するカロテノイド類を合成し、褐虫藻の細胞表面に局在していたため、強光ストレスの軽減機能を備えているという仮説を立てた。そこで、C-4077 の存在比率が 100%に上昇し、CFU カウントベースで色素細菌が約 8 倍増加した KAS-4077 と、親株 NIES-4077 の強光条件における光合成能力 (F_v/F_m)を比較した。非ストレス条件 ($50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) と強光条件 ($400 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)において、 F_v/F_m を継続して測定した。強光条件における親株 NIES-4077 の F_v/F_m は、KAS-4077 と比較して 14 日間継続して有意に減少していたことから、*Maribacter* sp. C-4077 は褐虫藻の強光ストレス軽減機能を持つと考えられた。

「褐虫藻は何らかの方法で細胞表面に生息する色素細菌を抗生物質から保護し、一方で細菌はカロテノイド類を生産することで藻体を強光ストレスから守る」という褐虫藻-色素細菌の共生関係を発見した。褐虫藻は f/2+KAS プレート上でコロニー形成をする際に、細胞外マトリクスを形成していたため、細胞表面の色素細菌はこのマトリクスに保護されて、抗生物質の作用から逃れていると考えている。「褐虫藻の細胞表面に生残する細菌は、なぜ色素細菌が多いのか?」、この疑問は未解明であるが、色素細菌には宿主である藻体を守る機能を持つことから、環境中で褐虫藻-色素細菌の共生関係が正の自然選択を受けた結果なのかもしれない。以上の結果を論文としてまとめ、アメリカ微生物学会の *Microbiology*

Spectrum 誌において報告した。

任意の CPB により褐虫藻の細胞表面をコーティングする細菌叢操作法の開発を目指して、藻体の無菌化を試みた。サンゴに共生する主要なクレード C 及びクレード D の褐虫藻に対して、液体培地と寒天培地における抗生物質処理を組み合わせた約 100 日間にわたる強力な抗生物質処理を実施した。それぞれを回復培養した後、抗生物質処理の効果を評価するために、①海洋細菌用マリンアガープレートを用いた培養試験、②16S rRNA 遺伝子に対するユニバーサルプライマーを用いた PCR 増幅、③FISH 法を用いた褐虫藻に共生する細菌の顕微鏡観察、の 3 つの評価を実施した。FISH 解析には全ての真正細菌を検出できる EUB338 プローブを使用した。いずれの褐虫藻培養液においても、マリンアガープレートで細菌コロニーの形成が確認されなかったが、クレード C 褐虫藻においては、FISH 法により細胞表面に細菌の顕著な残存を認められ、16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅も確認された。そこで、クレード D 褐虫藻を用いて、CPB により細胞表面をコーティングする細菌叢操作法の開発を目指した。クレード D 褐虫藻に対して各 CPB を接種した。約 3 ヶ月間後、CPB の感染が継続していることを確認した。回収した褐虫藻を滅菌海水で 3 回洗浄した後、マリンアガープレートで培養して CFU カウントした。初期接種菌量よりも増加していたことから、全ての CPB が褐虫藻への感染に成功し、培養液中で増殖していることが明らかになった。また褐虫藻の細菌叢組成を調べたところ、各 CPB の存在比率が 100%であったことから、細菌叢操作による CPB 共生褐虫藻の創出に成功していると考えられた。

ストレス耐性が向上した CPB 共生褐虫藻をサンゴに取り込ませるために、メントールによるアザミサンゴ白化誘導試験を実施した。メントールを含んだ海水で 8 時間処理した後、光合成阻害剤を含む海水で 16 時間処理を行った。この処理を 4 サイクル繰り返した後、通常の海水で飼育する回復期間を 3 日間設けた。再度、メントール処理を 4 日間実施し、褐虫藻を除去した非共生状態のサンゴ作成に成功した。このサンゴを用いて褐虫藻の再獲得実験を実施したが、褐虫藻添加区において組織内の褐虫藻密度の上昇は確認できず、褐虫藻を添加していないコントロール区で褐虫藻密度が上昇してしまった。コントロール区で褐虫藻密度の上昇を複数回確認したため、本手法により褐虫藻を完全に除去することは難しいと考えられた。現在、メントール処理とは異なる手法により CPB 共生褐虫藻をサンゴに取り込ませることに成功したため、飼育を継続して各種ストレス実験を実施している。

3. 今後の展開

本研究の成果により、培養褐虫藻は少なくとも数十種により細菌叢が構成されていることが明らかとなり、褐虫藻培養液中における細菌の局在や機能が各々で異なることがわかってきた。環境ストレスを緩和する Flavobacteriaceae 科などの培養にも成功してきているため、褐虫藻の細菌叢を構成する細菌種の機能解析をさらに進めることで、褐虫藻の生理機能を最大化する細菌叢ベストミックスを構築していきたい(5年以内)。沖縄県恩納村などではサンゴ幼生を使った種苗生産も行われていることから、細菌叢の制御により高機能化した褐虫藻を養殖場へ供給することで、気候変動に適応したサンゴホロビオント養殖に取り組んでいきたい(10年以内)。

気候変動や海洋汚染の影響を受けたサンゴは抵抗力が弱まり、感染症の罹患リスクが上

がることも報告されており、感染症のプロバイオティクス技術も開拓していきたい。現在、サンゴの抗菌ペプチド遺伝子の機能解析など、ホスト側の自然免疫機構の解明も進めているため、それらの情報も統合してサンゴホロバイオントの共生細菌叢をデザインすることで、白化や感染症に耐性を備えたサンゴ礁の創出を目指す(15~20年以内)。そして、世界中のサンゴ研究者とネットワークを広げていくことで、これらの技術をグレートバリアリーフ、カリブ海、紅海など地球上すべてのサンゴ礁を保全する技術へと展開させていきたい(25年以内)。

4. 自己評価

本筋の研究(CPB の分離培養、褐虫藻の無菌化、CPB 共生褐虫藻の創出など)を計画通りに遂行しながら、その過程で得た想定外の結果や失敗に真摯に向き合うことで、今後自身の研究を発展させる新しい発見をすることができた。特に、CPB 共生褐虫藻をサンゴに再獲得させる方法は、メントール法からの切り替えが非常に早かったため、ブレイクスルーを生み出すことができた。これは「次なる一手」を常に思考している自身の研究姿勢によるものである。また、実験サポート要員配置支援やチャレンジ増額などを受けながら、早い段階で研究実施体制(研究補佐員 1 名、大学院生 1 名)や研究環境(インキュベーター購入などの培養設備拡充など)を整え、少数精鋭ながらコミュニケーションを綿密に取ることで本研究を推進することができた。特に本研究は、「細菌-褐虫藻-サンゴ」という界をまたいだ 3 つの生物種を同時に扱うチャレンジングなものであり、サンプル管理に非常に長い時間を必要とする。日常的な生物の飼育管理の体制・環境を早急に整えることで、自身がそれらの生物種を用いた専門的な作業に集中し、再現性・信頼性の高い研究データを取得することができた。

本研究は、微生物の力により生態系を保全する「エコプロバイオティクス」という新しい概念を提唱し、ヒトを中心に展開されてきたプロバイオティクスの概念や細菌叢操作・解析技術を、環境分野の共生体であるサンゴホロバイオント研究へ拡張することで、世界のサンゴ礁保全をリードする先進的な育種法開発を目指している。このテーマは、SDGs「14. 海の豊かさを守ろう」の海洋資源を持続可能な開発に向けて、海洋を保全し利用するという目標に沿っている。地球温暖化の影響により、様々な水産養殖種で生育不良が報告されており、微生物の力を活用した「マリンプロバイオティクス技術」を開発していくことにより、持続的な水産養殖の発展にも繋げることができる。そのため、達成された際の社会的・経済的な波及効果は極めて大きい。さらに、本領域内外の研究者ともネットワークを構築しながら、得られた新しい視点・研究アイデアを積極的に自身の研究に取り入れることができた。その中でも、ACT-X の成果を元にスタートした海外の研究者との共同研究は、国際ネットワーク構築の第一歩となる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 2件

1. Ruriko Kitamura, Natsuko Miura, Michihiro Ito, Toshiyuki Takagi, Hideyuki Yamashiro, Yumi Nishikawa, Yuna Nishimura, Keita Kobayashi, Michihiko Kataoka. Specific Detection of Coral-Associated *Ruegeria*, a Potential Probiotic Bacterium, in Corals and Subtropical Seawater. *Marine biotechnology* (New York, N.Y.), 2021 年, 23, 576-589,



令和3年度マリンバイオテクノロジー論文賞(マリンバイオテクノロジー学会)

サンゴ礁周辺の海水から、サンゴの主要な病原菌である *Vibrio* 属細菌の生育を抑えることが期待される *Ruegeria* 属細菌を特異的に検出することに成功した。これまではサンゴを破壊しなければ得ることができなかった細菌が、サンゴを傷つけることなく簡単に採取できるようになったほか、海水から目的の細菌を取得する効率を高めることが可能となった。また、海水中に存在する細菌の中から、特定の細菌の存在割合を迅速に特定する方法も開発した。これにより、海水中に存在する *Ruegeria* 属細菌の割合が、季節変動することを初めて明らかにした。

2. Toshiyuki Takagi, Kako Aoyama, Keisuke Motone, Shunsuke Aburaya, Hideyuki Yamashiro, Natsuko Miura, Koji Inoue. Mutualistic interactions between dinoflagellates and pigmented bacteria mitigate environmental stress. *Microbiology Spectrum*, 2023 年, 11, e0246422

褐虫藻-色素細菌の関係を詳細に調査した。「褐虫藻は何らかの方法で細胞表面に生息する色素細菌を抗生物質から保護し、一方で細菌はカロテノイド類を生産することで藻体を強光ストレスから守る」という褐虫藻-色素細菌の共生関係を発見した。この過程で、褐虫藻の細胞表面に共生し、ゼアキサンチン合成能を持つ *Maribacter* 属 C-4077 及び C-2466、そしてピンク色の色素を合成する *Roseivirga* 属 DU1 を単離することに成功した。C-4077 及び C-2466 については、本研究の CPB 共生褐虫藻の創出にも利用した。

(2)特許出願 該当なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- ・高木俊幸, 佐々三依子, 青山華子, 井上広滋, 細菌叢操作法の確立に向けたサンゴ共生藻の無菌化方法の検討, 日本水産学会, 2022 年 3 月
- ・高木俊幸, 青山華子, 元根啓佑, 油屋駿介, 山城秀之, 三浦夏子, 井上広滋, 褐虫藻の細胞表面に生息する色素細菌は藻体の環境ストレスを緩和する, 日本サンゴ礁学会, 2022 年 11 月
- ・令和3年度マリンバイオテクノロジー論文賞(マリンバイオテクノロジー学会)
- ・「絶滅に瀕したサンゴを救う「病原菌からサンゴを守る善玉菌」を海水から容易に取得可能に！」東京大学大気海洋研究所ホームページ, <https://www.aori-u-tokyo.ac.jp/research/news/2021/20211029.html>
- ・サンゴを守る善玉菌 採取 海水から 琉大チーム成功, 沖縄タイムズ, <https://www.okinawatimes.co.jp/articles/-/860810>
- ・プレスリリース「サンゴの白化感受性には細菌も関係する?~共生藻の細胞表面から光保護機能を持つ色素細菌を発見~」, 東京大学・琉球大学・大阪公立大学・JST <https://www.jst.go.jp/pr/announce/20230119-3/index.html>