

多摩川河口域の微生物資源、
希少放線菌の多様性保全および新種の分離に向けた取り組み

2022年

寺原 猛

目次

1. 背景および目的	1
2. 方法	1
2.1 サンプリング	1
2.2 堆積物サンプルの細菌叢解析	2
2.3 堆積物サンプルからの希少放線菌 (non- <i>Streptomyces</i> 属) の分離	2
2.4 分離菌株の同定および諸性状の解析	3
3. 結果および考察	4
3.1 サンプリング	4
3.2 堆積物サンプルの細菌叢解析	5
3.3 堆積物サンプルからの希少放線菌 (non- <i>Streptomyces</i> 属) の分離と諸性状	7
4. まとめ	9
謝辞	10
参考文献	11

1. 背景および目的

微生物由来の抗生物質の約半数が、これまでに放線菌から取得されており (Bérdy, 2005), 放線菌は生理活性物質の生物資源として重要な位置づけである。放線菌は細菌の中で最も多様化した分類群であるが (宮道ら, 2001), 増殖速度が速い *Streptomyces* 属が優占的に分離されることが多い。そのため, 希少放線菌 (non-*Streptomyces* 属) の分離には選択的分離法が重要となる。放線菌の生育環境として知られる陸土壌が主に分離法の検討対象とされる中, 東京湾河口域の堆積物において, *Streptomyces* 属の増殖を抑制し, 希少放線菌の一種である *Micromonospora* 属を選択的に分離する手法を報告した (Terahara *et al.*, 2013)。また, 希少放線菌は新たな抗生物質の探索源となりうる生物資源としても注目されている (Tiwari & Gupta, 2012)。

また, 生物多様性は普遍的に重要であり, それらの保全はより一層求められている。多摩川流域の生態系は豊かであるが, 希少放線菌の多様性については報告されていない。多摩川河口域はその水深が数 m 程度から羽田沖で約 20 m に急深する特異な地形でもあり, 多摩川河口域にて採取した堆積物から新種の希少放線菌 (*Lysinimicrobium sediminis* sp. nov.) を報告した (Hamada *et al.*, 2017)。そのため, 多摩川河口域における希少放線菌の更なる解析が求められる。

そこで, 本研究では, このような背景を踏まえ, 多摩川河口域の微生物資源を保全するための基礎データを収集するとともに, 多摩川河口域の堆積物における希少放線菌の多様性を調べ, 希少放線菌の新種の分離に取り組むことを目的とした。

2. 方法

2.1 サンプルング

2020年8月, 11月, ならびに2021年11月, 本学練習船「ひよどり」により, 多摩川河口域の2地点 (T1, T2) と東京湾の1地点 (T3) において, エクマンバージ式採泥器 (離合社) を用いて堆積物を採取した。また, 採取地点にて採水を行うとともに, 水質計 (Hydrolab DS5 - Multiparameter Data Sonde, OTT HydroMet) を用い, 環境データ (水温や塩分など) の測定も行った。サンプルングの様子を図1に, 採取地点を図2に示す。

なお, 当初は8回のサンプルング, 上記に加えて2020年4月, 5月, 2021年1月, 5月, 8月も計画していたが, これら5回のサンプルングは新型コロナウイルスによる影響 (東京都における緊急事態宣言) のため, 実施することができなかった。



図1 多摩川河口域でのサンプリングの様子

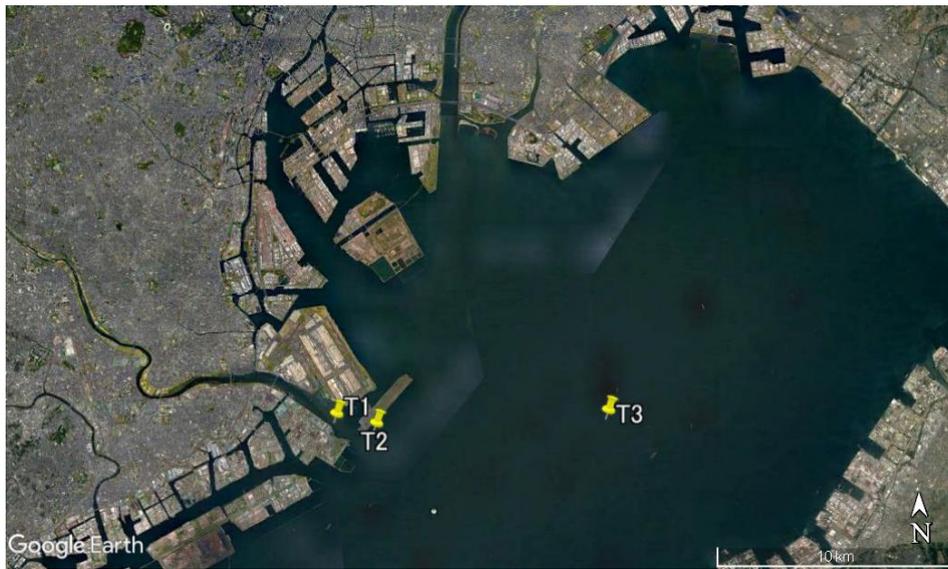


図2 採取地点（多摩川河口域：T1, T2, 東京湾：T3）

2.2 堆積物サンプルの細菌叢解析

2020年8月, 11月, ならびに2021年11月に採取した堆積物からDNA抽出キット (ISOIL for Beads Beating, ニッポン・ジーン) を用い, プロトコールに従ってDNAをそれぞれ抽出した。抽出DNAの濃度は蛍光光度計 (Qubit 2.0 Fluorometer, Invitrogen) によって確認され, 16S rRNA遺伝子のV3-V4領域について, ライブラリー調製キット (MetaVx Library Preparation kit, GENEWIZ) により調製後, 次世代シーケンサー (Miseq, Illumina) を用いて, 各堆積物サンプルの塩基配列データを取得し, 細菌叢解析を行った。

2.3 堆積物サンプルからの希少放線菌 (non-*Streptomyces* 属) の分離

採取した堆積物サンプル0.1 gを滅菌生理食塩水により適宜希釈した。そして, 多摩川河口域の堆積物からの希少放線菌の分離を目的として, 以下の手法にて様々な培地に希釈液を塗抹した後, 27 °Cで培養した。

①. 熱処理（希釈液を55℃で30分間のインキュベーション）により、*Streptomyces*属の増殖抑制を行い、ISP2培地やISP4培地（宮道ら，2001）により希少放線菌の分離を試みた。

②. 熱処理（希釈液を55℃で30分間のインキュベーション）とISP4培地への抗生物質（終濃度50 μ g/mLのシクロヘキシミド）の添加を行い、希少放線菌の分離を試みた。

③. 放線菌の二次代謝産物生合成遺伝子群には未発現のものが含まれるとの報告もある中（Ohnishi *et al.*, 2008），重金属を添加した培地では，非添加系とは異なる二次代謝産物が生産されたとの報告（Haferburg *et al.*, 2009）に着目し，重金属（ Na_2MoO_4 ， $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ）をそれぞれ含有した培地を行い，放線菌の代謝能を変えることで希少放線菌の分離を試みた。

また，当初の予定にはなかったNaCl濃度3%としたBushnell-Haas medium（Bushnell & Haas, 1941）に滅菌済みOlive oil（健栄製薬）などの疎水性基質を加えた培地を用い，バイオサーファクタント（以下，BS）を産生する希少放線菌の分離も試みた。

2.4 分離菌株の同定および諸性状の解析

分離菌株に対して，16S rRNA遺伝子の塩基配列を解析し，同定を行った。まず，分離菌株のコロニーからMightyPrep reagent for DNA（タカラバイオ）により，PCRに用いる鋳型DNAを調製した。続いて，細菌の16S rRNA遺伝子のユニバーサルプライマーである，27F（5' - AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3' ），および1492R（5' - GGC TAC CTT GTT ACG ACT T -3' ）を用い，（94℃，5分間）+（94℃，30秒間 + 55℃，30秒間 + 72℃，90秒間） \times 30サイクル +（72℃，7分間）の条件でPCR反応を行った。次に，1.5%アガロースゲル電気泳動により，PCR産物を確認した後，FastGene Gel/PCR Extraction Kit（日本ジェネティクス）を用い，PCR産物を精製した。そして，BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems）を用いたサイクルシーケンス反応を行った後，エタノール沈殿によって精製し，DNAシーケンサー（3130xl Genetic Analyzer，Applied Biosystems）により，16S rRNA遺伝子の塩基配列を解読した。得られた塩基配列データをNCBI BLAST（<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>）のデータベースで照合し，分離菌株の種の同定を行った。

また，新型コロナウイルスによる緊急事態宣言のため，サンプリングの実施回数が限られてしまったこともあり，2019年に採取した堆積物から分離された菌株（BSを産生する希少放線菌）の性状も解析することとした。

3. 結果および考察

3.1 サンプルング

2020年8月, 11月, ならびに2021年11月, 多摩川河口域の2地点(T1, T2)と東京湾の1地点(T3)において, 本学練習船「ひよどり」により, 堆積物と水を採取するとともに, 環境データ(水温や塩分など)を測定した。環境データを表1に示す。多摩川河口域は羽田沖で急深しており, T1の水深が約3-4 mであったのに対し, T2の水深は約18-19 mであり, T3の水深とほぼ同じであった。T1は水深が浅く, 表層と底層の水温の差はほとんどなかったが, T2とT3では表層と底層の水温差が同様に確認された。特に, 2020年8月には, 表層と底層の水温差が10°C以上であった。また, 多摩川河口域のT1やT2では河川水の流入により, 塩分が薄くなっていることが示された。

表1 各採取地点での環境データ

採取地点	採取年月		水深(m)	水温(°C)	塩分(psu)	酸化還元 電位(mV)
T1	2020.08	表層	0.03	29.37	12.86	27
		底層	3.62	28.76	21.21	39
	2020.11	表層	0.10	17.45	28.95	154
		底層	2.83	17.49	30.78	167
	2021.11	表層	0.06	16.98	19.41	89
		底層	4.07	17.27	28.75	92
T2	2020.08	表層	0.12	29.01	20.64	58
		底層	18.54	16.72	34.21	64
	2020.11	表層	0.12	17.14	29.30	61
		底層	18.50	19.40	33.95	45
	2021.11	表層	0.37	17.06	26.38	85
		底層	19.44	18.58	32.52	83
T3	2020.08	表層	0.05	30.19	25.43	88
		底層	20.83	17.08	34.11	93
	2020.11	表層	0.36	17.38	31.88	164
		底層	21.83	19.68	33.70	128
	2021.11	表層	0.07	17.08	30.64	89
		底層	21.75	18.51	32.46	90

3.2 堆積物サンプルの細菌叢解析

堆積物から抽出したDNAを用い、16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を対象にして、次世代シーケンサーにより塩基配列データを取得した。各堆積物サンプルから得られたリード数(塩基配列のデータ数)、クオリティーチェック後のリード数、塩基配列の平均長、および GC(%) を表 2 に示す。

表 2 各堆積物サンプルから得られたリード数、クオリティーチェック後のリード数、塩基配列の平均長、および GC(%)

採取地点	採取年月	サンプル名	リード数	クオリティーチェック後		
				リード数	平均長(bp)	GC(%)
T1	2020. 08	T1_01	40, 112	37, 563	458	53. 49
	2020. 11	T1_02	40, 974	38, 873	458	53. 64
	2021. 11	T1_03	58, 033	50, 517	458	53. 77
T2	2020. 08	T2_01	50, 639	44, 797	458	53. 50
	2020. 11	T2_02	50, 461	47, 337	458	53. 65
	2021. 11	T2_03	61, 319	53, 665	458	53. 56
T3	2020. 08	T3_01	48, 135	46, 245	458	53. 30
	2020. 11	T3_02	50, 712	46, 377	458	53. 29
	2021. 11	T3_03	61, 379	53, 838	458	53. 27

各堆積物サンプルからのクオリティーチェック後のリード数は、37, 563 から 53, 838 であった。クオリティーチェック後の塩基配列データより、塩基配列間で 97%以上の類似性を有する配列について、OTU(Operational Taxonomic Unit, 操作上の分類単位)としてクラスタリングを行った。そして、各 OTU の代表的な塩基配列をデータベースと照合し、同定を行った。

各堆積物サンプルの細菌叢について、目 (order) レベルでの主なものの相対的割合を図 3 に示す。各堆積物サンプルの細菌叢の 50-60%程度が 10 個ほどの目によって構成されていた。硫酸塩還元菌として知られる Desulfobulbales, Desulfobacterales, および Desulfuromonadales が堆積物サンプルから検出されたことは、堆積物中の嫌気的環境下で硫酸イオンから硫化水素への還元が生じているためと考えられる。また、Bacteroidales, Flavobacteriales, および c_Gammaproteobacteria_Unclassified (Gammaproteobacteria 綱であるが、目レベルでは未同定) は、各堆積物サンプルの細菌叢にそれぞれ 5-10%程度の割合で存在していることが示された。

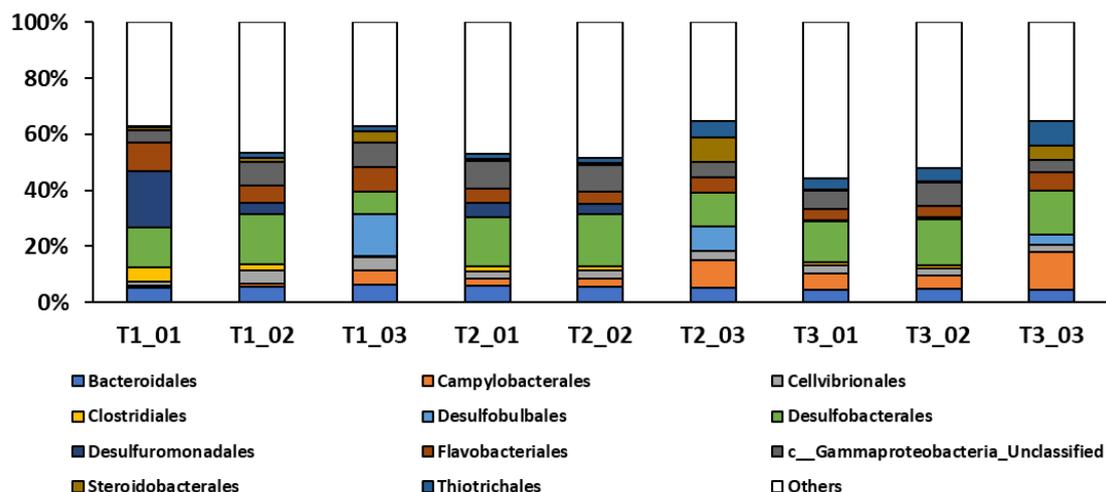


図3 各堆積物サンプルの細菌叢（目レベルでの相対的割合）

放線菌（Actinobacteria, 門 (phylum) レベル）は、各堆積物サンプルの細菌叢のうち、地点 T1 で平均 2.78%、地点 T2 で平均 1.88%、地点 T3 で平均 1.18% であり、地点 T1 が高く、細菌叢に占める割合は地点 T3 の 2 倍以上であった。放線菌は代表的な土壌細菌であり、肥沃な土壌 1 g には 100 万個あるいはそれ以上という膨大な数が生息している（宮道ら, 2001）といわれている。土壌に存在する放線菌は河川水によって運ばれることから、細菌叢に占める放線菌の割合は T1 が最も高く、T2, T3 の順に少なくなったことは妥当であると考えられる。また、目 (order) レベルでは、Streptomycetales（増殖速度が速く、分離しやすい *Streptomyces* 属を含む）よりも Actinomarinales が多く検出された。Actinomarinales は 16S rRNA 遺伝子のメタゲノム解析結果を基にして、GC 含量が低く、浮遊性 (free-living) であり、極小の細胞サイズの海洋の放線菌のグループに関し、*Candidatus Actinomarinales* として提唱された (Ghai *et al.*, 2013)。現在まで分離されていないが、沿岸域の砂において炭素鉱物化の重要な役割を担っているのではないかと示唆されている (Miksch *et al.*, 2021)。また、南シナ海や西地中海の海水サンプルからの次世代シーケンサーを用いた解析 (Lu *et al.*, 2022; Mena *et al.*, 2022) などの報告はなされているが、現在のところ、東京湾における Actinomarinales に関する報告は無い。今回の解析結果より、T1, T2, ならびに T3 のいずれの堆積物サンプルからも Actinomarinales が検出されたことから、多摩川河口域をはじめとして東京湾にも Actinomarinales が存在していることが示唆された。

また、各堆積物サンプルの細菌叢の多様性指数 (shannon index) を表 3 に示す。多摩川河口域の T1, T2 のほうが東京湾の T3 よりも多様性がやや高い傾向であったが、顕著な差ではなかった。

表3 各堆積物サンプルの細菌叢の多様性指数

採取地点	採取年月	shannon
T1	2020.08	9.864
	2020.11	11.081
	2021.11	6.627
T2	2020.08	11.108
	2020.11	11.089
	2021.11	6.357
T3	2020.08	10.610
	2020.11	10.611
	2021.11	6.075

3.3 堆積物サンプルからの希少放線菌 (non-*Streptomyces* 属) の分離と諸性状

多摩川河口域の堆積物サンプルを滅菌生理食塩水により適宜希釈し、様々な培地に希釈液を塗抹し、希少放線菌の分離を試みた。分離菌株に対し、16S rRNA 遺伝子の塩基配列を解析した結果、ISP4培地により *Micrococcus* 属、*Micromonospora* 属、および *Verrucosispora* 属の希少放線菌が分離された。*Micromonospora* 属は、荒川河口域の堆積物からも同様に分離されており (Terahara *et al.*, 2013)、多摩川河口域でも確認することができた。また、*Verrucosispora* 属は、現在知られているのが僅か11種であり、東京湾からの分離例は報告されていないため、多摩川河口域の多様性が高いことが示唆された。

さらに、重金属 (モリブデンやマンガン) の添加培地や、疎水性基質を添加して NaCl 濃度3%とした Bushnell-Haas medium も用い、希少放線菌の分離を試みた。その結果、疎水性基質を添加して NaCl 濃度3%とした Bushnell-Haas medium からは、*Vibrio* 属などの細菌が分離され、放線菌は分離されなかった。また、モリブデンを添加した培地からは、グラム陽性菌が分離されたが、16S rRNA 遺伝子の塩基配列を解析した結果、すべて *Bacillus* 属であり、希少放線菌を分離することはできなかった。一方、マンガンを添加した培地からは、*Rhodococcus* 属の希少放線菌が分離された。マンガン添加と *Rhodococcus* 属の分離との関連性は明らかではなく、更なる検討が必要である。

また、これらの希少放線菌の分離株には、新種と推定される菌株はなかった。サンプリングの実施回数が限られたこともあり、2019年に採取した堆積物から分離された菌株 (BSを産生する希少放線菌) の性状を解析することとした。

2019年11月に多摩川河口域（地点T2）で採取した堆積物から分離された希少放線菌（菌株M）は、16S rRNA遺伝子の塩基配列のデータより *Microbacterium* 属と同定された。多摩川河口域での *Microbacterium* 属の分離例（浦野ら，2013）はあるが、ほとんど報告されていない。*Microbacterium* 属は原油分解菌として知られていることから（Xue *et al.*, 2015），菌株Mの炭化水素の分解能について，2,6-dichlorophenol indophenol (2,6-DCPIP) assay (Hanson *et al.*, 1993)により調べた。BSを産生する菌株Aとともに，菌株Mの2,6-DCPIP assayを行った結果を図4に示す。その結果，菌株Mでは無色透明となることが示され，菌株Mは炭化水素の分解能を有することがわかった。今後，本菌株について，炭化水素の分解能と産生されるBSとの関連性や原油を用いた分解など，更なる検討を行う予定である。



図4 2,6-DCPIP assayによる炭化水素の分解能の評価

4. まとめ

新型コロナウイルスによる影響（東京都における緊急事態宣言）のため、当初計画の半分以下となってしまったが、2020年8月、11月、および2021年11月、多摩川河口域（地点 T1, T2）と東京湾（地点 T3）にて、サンプリングを行った。堆積物から DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を対象として細菌叢を解析した結果、細菌叢の 50-60%程度が 10 個ほどの目 (Order: Desulfobacterales, Desulfobulbales, Desulfuromonadales, Bacteroidales, Flavobacteriales など) で構成されていた。放線菌は細菌叢に占める割合は高くなかったが、各地点から 1-3%程度検出された。細菌叢に占める放線菌の割合は T1 が最も高く (T3 の 2 倍以上)、T2, T3 の順に少なくなったことは、土壌中の放線菌が河川水により運ばれたものと考えられ、妥当であるといえる。また、すべての堆積物サンプルから Streptomycetales (増殖速度が速く、分離されやすい *Streptomyces* 属を含む) よりも Actinomarinales が多く検出された。Actinomarinales は、GC 含量が低く、浮遊性であり、極小細胞サイズの海洋の放線菌で未だに分離されていない。本研究により、多摩川河口域と東京湾にも Actinomarinales の存在が示唆され、多摩川河口域の希少放線菌に関する新たな知見が得られた。このことは、社会において、多摩川河口域の生態系を新たな観点から評価することに繋がる。また、現在のところ、日本沿岸域における Actinomarinales に関する報告も無いことから、今後東京湾をはじめとして日本沿岸域にて更なる解析を行うことで、日本沿岸域での Actinomarinales に関する新たな知見が得られると考えられる。

また、多摩川河口域の堆積物サンプルから、希少放線菌の分離を試みた。上述のように、新型コロナウイルスによる制限により、サンプル数は当初計画の半分に満たなかったが、当初の予定にはなかった培地を用いるなど、様々な培地にて検討を行った。その結果、*Micrococcus* 属、*Micromonospora* 属、*Rhodococcus* 属、および *Verrucosispora* 属の希少放線菌が分離された。*Verrucosispora* 属は、現在知られているのが僅か 11 種であり、東京湾からの分離例は無い。本研究により、多摩川河口域における希少放線菌の多様性の高さが示唆され、社会において、多摩川河口域の生態系の豊かさとその多様性保全の重要性が再認識されることに繋がる。なお、これらの分離株には、新種と推定される菌株はなかった。当初計画にとどまらず、様々な条件での検討を行ったが、サンプル数が十分ではなく、また新型コロナウイルスの感染防止対策として、大学への立ち入りの自粛などにより、当初予定していたように実験を行うことはできなかった。微生物の分離に関する研究は、微生物学の根幹を成す基礎研究として重要であり、本研究結果は多摩川河口域における希少放線菌の分離についての端緒となり得る。今後に向けて、サンプリングによりサンプル数を増やすとともに、分離条件の更なる検討を行うことにより、希少放線菌、特に新種の分離に繋げることが課題である。

謝辞

本学船舶・海洋オペレーションセンター，ならびに本学練習船「ひよどり」の皆様には，多摩川河口域ならびに東京湾でのサンプリングに際し，大変お世話になりました。心よりお礼申し上げます。

参考文献

- 浦野直人, 岡井公彦, 相川和也, 田中陽一郎, & 石田真巳. (2013). 多摩川流域における多剤耐性菌の蔓延度解析. *科学・技術研究*, 2(2), 131-136.
- 宮道 慎二ら編. (2001) 放線菌の分類と同定, 日本放線菌学会 編, 財団法人日本学会事務センター
- Bérdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *The Journal of antibiotics*, 58(1), 1-26.
- Bushnell, L. D., & Haas, H. F. (1941). The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. *Journal of bacteriology*, 41(5), 653-673.
- Ghai, R., Mizuno, C. M., Picazo, A., Camacho, A., & Rodriguez-Valera, F. (2013). Metagenomics uncovers a new group of low GC and ultra-small marine Actinobacteria. *Scientific reports*, 3(1), 1-8.
- Hanson, K. G., Desai, J. D., & Desai, A. J. (1993). A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. *Biotechnology techniques*, 7(10), 745-748.
- Haferburg, G., Groth, I., Möllmann, U., Kothe, E., & Sattler, I. (2009). Arousing sleeping genes: shifts in secondary metabolism of metal tolerant actinobacteria under conditions of heavy metal stress. *Biometals*, 22(2), 225-234.
- Hamada, M., Saitou, S., Terahara, T., Imada, C., & Tamura, T. (2017). *Lysinimicrobium sediminis* sp. nov., an actinobacterium isolated from estuary sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(9), 3393-3397.
- Lu, Y., Zhang, Y., Wang, J., Zhang, M., Wu, Y., Xiao, X., & Xu, J. (2022). Dynamics in bacterial community affected by mesoscale eddies in the northern slope of the South China Sea. *Microbial Ecology*, 83(4), 823-836.

Mena, C., Reglero, P., Balbín, R., Martín, M., Santiago, R., & Sintés, E. (2022). Dynamics of actively dividing prokaryotes in the western Mediterranean Sea. *Scientific reports*, *12*(1), 1–14.

Miksch, S., Meiners, M., Meyerdierks, A., Probandt, D., Wegener, G., Titschack, J., Jensen, M. A., Ellrott, A., Amann, R., & Knittel, K. (2021). Bacterial communities in temperate and polar coastal sands are seasonally stable. *ISME Communications*, *1*(1), 1–11.

Ohnishi, Y., Ishikawa, J., Hara, H., Suzuki, H., Ikenoya, M., Ikeda, H., Yamashita, A., Hattori, M., & Horinouchi, S. (2008). Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *Journal of bacteriology*, *190*(11), 4050–4060.

Terahara, T., Kobayashi, T., & Imada, C. (2013). An effective method based on wet-heat treatment for the selective isolation of *Micromonospora* from estuarine sediments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *29*(9), 1677–1684.

Tiwari, K., & Gupta, R. K. (2012). Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics. *Critical reviews in biotechnology*, *32*(2), 108–132.

Xue, J., Yu, Y., Bai, Y., Wang, L., & Wu, Y. (2015). Marine oil-degrading microorganisms and biodegradation process of petroleum hydrocarbon in marine environments: a review. *Current microbiology*, *71*(2), 220–228.

多摩川河口域の微生物資源、希少放線菌の多様性保全および新種の分離に
向けた取り組み

(研究助成・学術研究 VOL. 51 - NO. 365)

著 者 寺原 猛

東京海洋大学 海洋生物資源学部門 助教 (採択当時)

発行日 2022年10月

発行者 公益財団法人 東急財団

〒 150-8511

東京都渋谷区南平台町5番6号

TEL (03) 3477-6301

<http://foundation.tokyu.co.jp>