

## 7. 海洋深層水の微生物群集構造解析と有用微生物の分離

○今田千秋<sup>1</sup>, 梁 太熙<sup>1</sup>, 山田勝久<sup>2</sup>, 中山二郎<sup>3</sup>, 寺原 猛<sup>1</sup>, 小林武志<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup> 東京海洋大, <sup>2</sup> 株式会社ディーエイチシー, <sup>3</sup> 九州大)

【目的】近年、陸上由来の新規有用物質の発見は減少の一途をたどっている。そのため海洋由来微生物に関心が高まりつつある。特に最近では海洋深層水(以下、DSW)中の微生物にも注目が集まるようになってきた<sup>1)</sup>。DSWは表層水(以下、SSW)と比較して微生物数が極めて少ないことが知られているが<sup>2)</sup>、DSWの微生物は低温、高水圧、低有機物濃度の極限環境に適応していることから、新しい有用物質を生産している可能性が考えられる。そこで本研究では日本各地のDSW取水設備からDSWおよびSSWをそれぞれ入手して、次世代シーケンサ法を用いて微生物群集構造を解析し、未同定微生物の多いサンプルから代表的な有用微生物として放線菌を選択し、得られた放線菌分離株について抗がん物質生産性を調べることを目的とした。

【方法】北海道羅臼、北海道岩内、富山県滑川、伊豆赤沢、高知県室戸、鹿児島県甕島および沖縄県久米島の各取水設備からDSWおよびSSWをそれぞれ20入手し、微生物群集組成解析試料として用いた。各試料を孔径3μmのニウクレポアフィルターでプレ濾過後、濾液をさらに0.2μmのフィルターにて濾過し、フィルター上に微生物を捕集した。これらの微生物から常法によりDNAを抽出後、細菌用の16S rRNA遺伝子増幅用ユニバーサルプライマーを用いてPCRを行い、得られた増幅産物を次世代シーケンサ(GSFLX Titanium, Roche)に供して微生物群集構造を解析した。次に伊豆赤沢の取水設備よりDSWの懸濁物の濾過に用いる使用済みのバッグ状フィルターを入手し、それに捕集された微生物をISP-No. 4培地上で分離培養した。培養後、肉眼で放線菌と判断されたコロニーを釣菌し、分離株として保存した。これらの分離株について液体培養を行い、得られた培養液上清についてB16マウスメラノーマ細胞(以下、B16細胞)を用いてがん細胞に対する毒性を評価した。次に、正常ヒト皮膚由来線維芽細胞(以下、NB1細胞)を用いて正常細胞に対する毒性を調べた。なおB16細胞に対し、特異的に強い毒性を示した株については、16S rRNA遺伝子解析による種の同定を行った。

【結果及び考察】日本各地の取水設備のDSWおよびSSWについて微生物群集構造を調べた結果、伊豆赤沢および久米島に未同定微生物が多いこ

とが判明した。そこでこれらの試料より、表1に示すように合計215株の放線菌を分離して液体培養を行った。その結果、表2に示すように15株の培養液上清にB16細胞に対する細胞毒性が認められた。これら15株についてさらにNB1細胞への影響を調べたところ、3株がNB1細胞に強い毒性を示したが、他の12株は毒性が低かった。そこで、これらの12株について16S rRNA遺伝子解析を行ったところ、AKA32株(伊豆赤沢由来)は新種の放線菌であることが示唆された。現在、この株を有望株として選択し、培養上清から抗がん活性物質の単離・精製を行っているところである。

表1. DSWおよびSSWからの放線菌分離株数

分離源	伊豆赤沢		久米島	
	DSW	SSW	DSW	SSW
Streptomyces 属*	37	分離中	21	8
Streptomyces 属以外	94	分離中	46	9
合計	131	0	67	17

\*肉眼的観察

表2. 抗癌活性15株の諸性状

名称	分離源	近縁種	相同性% (bp)	活性
AKA32	伊豆赤沢 DSW	<i>Nonomuraea asiatica</i>	97.3(1435)	中*
AKA39	伊豆赤沢 DSW	<i>Streptomyces bingchenggensis</i>	99.6(1476)	高
AKA43	伊豆赤沢 DSW	<i>Actinomadura geliboluensis</i>	99.4(1280)	高
AKA103a	伊豆赤沢 DSW	<i>Streptomyces heilongjiangensis</i>	98.3(1078)	中
AKA108	伊豆赤沢 DSW	<i>Streptomyces sanglier</i>	97.1(1046)	中
AKA119	伊豆赤沢 DSW	<i>Micromonospora chalcea</i>	99.3(1052)	中
AKA128	伊豆赤沢 DSW	<i>Streptomyces pulveraceus</i>	99.7(1162)	高
SA1	久米島 SSW	同定中		中
SA2	久米島 SSW	<i>Streptomyces turgidiscabies</i>	99.9(1265)	高
SA4	久米島 SSW	<i>Mycobacterium poriferae</i>	97.7(1498)	中
DA2	久米島 DSW	同定中		中
KD5	久米島 DSW	<i>Streptomyces globosus</i>	98.5(1262)	中
KD7	久米島 DSW	<i>Actinobacteria bacterium</i>	98.7(1263)	中
KD38	久米島 DSW	<i>Streptomyces antibioticus</i>	99.8(1284)	高
KS30	久米島 SSW	同定中		中

\*高: 70%以下の細胞活性、中: 50%以下の細胞活性

<sup>1)</sup> Terahara et al., Gene, **576**, 696-700 (2016).

<sup>2)</sup> 今田千秋 海洋深層水研究, **13**, 33-40 (2012).