

## 論文内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成10年度博士課程 入学  
氏名 倉橋 みどり  
指導教官名 横田 明

### 論文題目 海洋生物に由来する細菌の系統分類学的研究

#### ● 目的

近年、生物の種多様性に関する研究は、多方面から積極的に取り組まれている。環境中の DNA 断片を分析したり、蛍光プローブを用いるなど、培養によらない解析手法の発展にともない、その多様性が次々に明らかにされている。本研究では、未知領域の細菌を分離し、培養することを目的とする。分離、培養に重点を置いた主な理由は、遺伝子資源の確保にある。

現在、細菌の分離、培養は、大きく2つの方向からアプローチされている。ひとつは、生きているが培養困難な状態にある微生物を詳細に研究する事によって、VBNC (Viable but nonculturable) 状態から culturable な状態へ転換させる方法を開発しようとするものである。もう一つは、微生物の発見以来、多くの熱心な研究者たちによって膨大な数の細菌が記載されてきているが、人類がこれまで容易に接近することのできなかつた極限環境などから、新規性の高い細菌を探索していく方向である。しかし身近な環境は、本当に探索しつくしたのだろうか。そこで本研究では、身近な海洋生物の内臓を新規バクテリア探索のフロンティアと位置付け、その多様性を明らかにした。

#### ● 方法

1998年から2000年の間に、東京都、千葉県、神奈川県、静岡県において、磯採集とスキューバダイビングにより、分離源海洋生物として主に軟体動物をサンプリングした。取り出した内臓をホモジネートし、滅菌生理食塩水で希釈し菌液を得た。Marine 培地上、塗抹法にて、23℃で数日間培養し、コロニーを単離し、純粋培養化した。各菌株より DNA を抽出し、16S rDNA の後半約 500bp の部分塩基配列を決定し、相同性検索を行った。その結果、既知種との相同性が95%以下の株を

選出し、16S rDNA の全塩基配列を決定した。その配列データを基に、多重アライメント計算を行い、NJ 法による系統樹を作成した。各株の新規性を明らかにするために、生理・生化学試験と化学分析を行った。生理・生化学試験は、菌液を調製した後、基質分解能や発育試験、糖類の資化性能を観察した。化学分析については、DNA 塩基組成、菌体脂肪酸組成、呼吸鎖キノン分子種の分析を行った。また、必要のある株については、DNA-DNA ハイブリダイゼーション検定も行った。

## ● 結果

21 種類の海洋生物から、116 株の細菌を分離した。分離した細菌の 16S rDNA の後半約 500bp の部分塩基配列による相同性検索に基づいて同定した結果、*Proteobacteria* 74 株、*Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* group 12 株、*Bacillus/Clostridium* group 2 株、*Actinobacteri* 2 株であり、1 株は酵母の *Saccharomycotina* であった。16S rDNA の既知種との塩基配列相同性が 95%以下であったのは、116 株の分離株のうち 17 株であった。16S rDNA の塩基配列を基に、NJ 法によって作成した系統樹では、分離された 17 株は、*Alteromonas* group (8 株)、*Rhodobacter* group (4 株)、*Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* group (5 株)の 3 つの細菌グループにわけられた。

### *Alteromonas* ( $\gamma$ -*Proteobacteria*) group (Fig.1)

MKT92 : *Thalassononas* との 16S rDNA の相同性は、94%であり、*Thalassononas* 属、*Colwellia* 属とクラスターを形成した。MKT92 に対して新属を提唱する。

MKT82, 86, 87, 89, 106, 112 : この 6 株は、異なる種または同種の別個体の海洋生物から分離されたにもかかわらず、互いに非常に高い相同性を示した。この 6 株と、*Thalassononas* 属、*Glaciecola* 属、*Alteromonas* 属、*Pseudoalteromonas* 属 との 16S rDNA の相同性は、89~91%であった。またこの 6 株で明らかに単系統群を形成した。MKT82, 86, 87, 89, 106, 112 に対して新属を提唱する。

MKT110 : 16S rDNA の相同性は、*Pseudomonas andersonii* と 90%、*Marinobacter* 属と 89%であり、系統樹上でも、*Pseudomonas* 属、*Marinobacter* 属とクラスターを形成した。MKT110 に対して新属を提唱する。

### *Rhodobacter* ( $\alpha$ -*Proteobacteri*) group (Fig.2)

MKT107 : 16S rDNA の相同性は、[*Ruegeria*] *gelatinovorans*, *Sulfitobacter mediterraneu*, *Sulfitobacter pontiacus* のいずれとも 94%であった。系統樹上では、*Antarctobacter* 属、*Sagittula* 属とクラスターを形成した。MKT107 に対して新属を提唱する。

MKT95 : 16S rDNA の相同性は、[*Roseobacter*] *gallaecienis* と [*Ruegeria*] *atlantica* のいずれとも 96%であったが、系統樹上では、[*Roseobacter*] *gallaecienis* と [*Ruegeria*] *algicola* とクラスター形成した。[*Roseobacter*] *gallaecienis* と [*Ruegeria*] *algicola* は誤分類と考えられるので、MKT95 とまとめて新属を提唱する。

MKT84, 94 : この 2 株は、異なる種の海洋生物から分離されたにもかかわらず、2 株間の 16S rDNA の相同性は 100% であった。近縁属との 16S rDNA の相同性は、[*Stappia*] *stellulatum* と [*Roseibium*] *denhamense* のいずれとも 94%であった。MKT89, 94 に対して新属を提唱する。

Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides group (Fig.3)

MKT38 : *Gelidibacter algens* との 16S rDNA の相同性は、90%であった。一方、系統樹上では、*Zobellia* 属、[*Cytophaga*] 属とクラスターを形成した。MKT38 に対して新属を提唱する。

MKT93 : 16S rDNA の相同性は、*Polaribacter* 属、*Tenacibaculum* 属いずれとも 94%であり、*Polaribacter* 属、*Tenacibaculum* 属とクラスターを形成し。MKT93 に対して新属を提唱する。

MKT44 : [*Cytophaga*] *fermentans* との 16S rDNA の相同性は、96%であり、系統樹上でも[*Cytophaga*] *fermentans* とクラスターを形成した。[*Cytophaga*] *fermentans* は誤分類と考えられるので、MKT44 とまとめて新属を提唱する。

MKT111 : *Flammeovirga aprica* との 16S rDNA の相同性は、92%であり、系統樹上でも *Flammeovirga aprica* とクラスターを形成した。MKT111 に対して新属を提唱する。

MKT109 : *Persicobacter diffluens* との 16S rDNA の相同性は、91%であり、系統樹上でも *Persicobacter diffluens* とクラスターを形成した。MKT109 に対して新属を提唱する。

●まとめ

身近な海洋生物の内臓から、当初の予想を遥かに超える高率で新規性の高い株が分離され、このフィールドにおけるバクテリアの種多様性に関する分類学上の新たな知見が得られた。

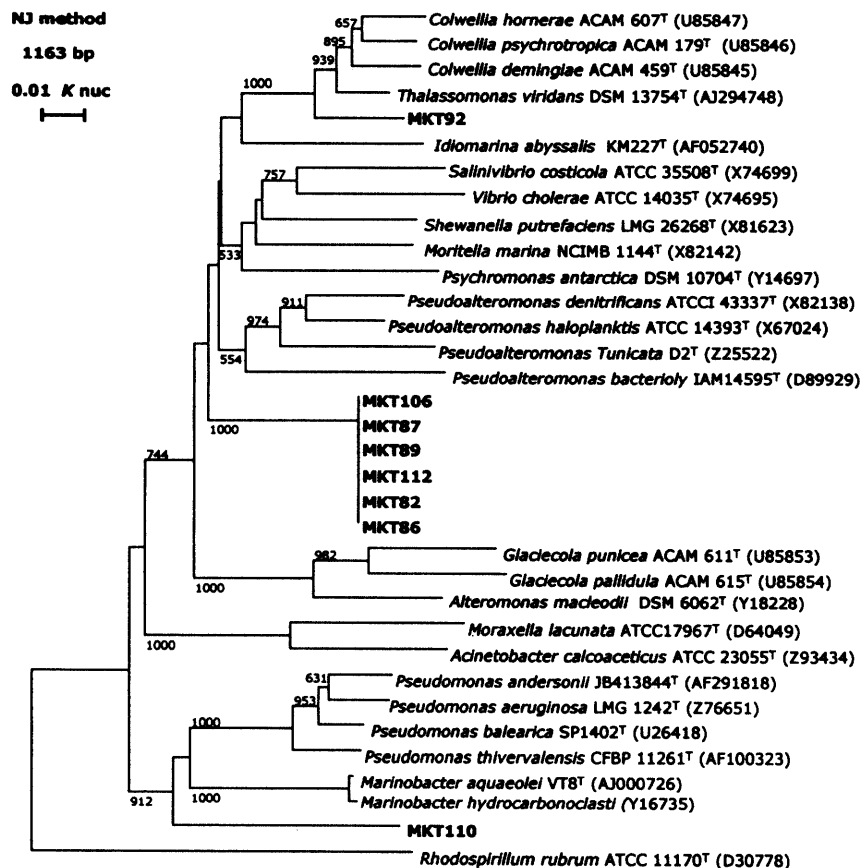


Fig. 1

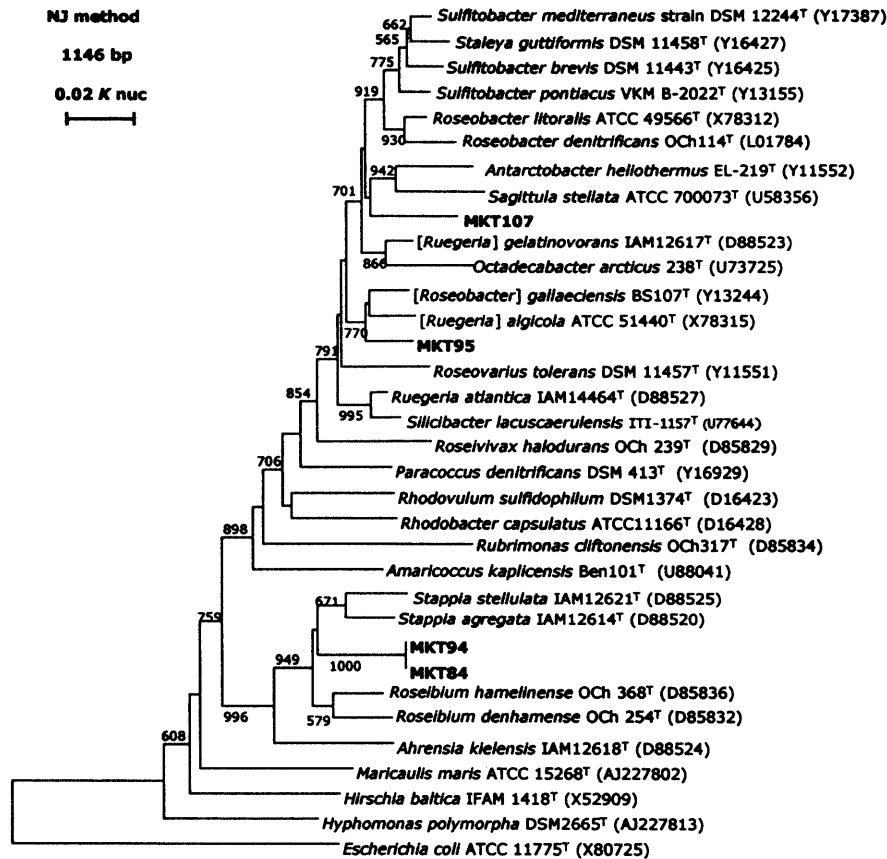


Fig.2

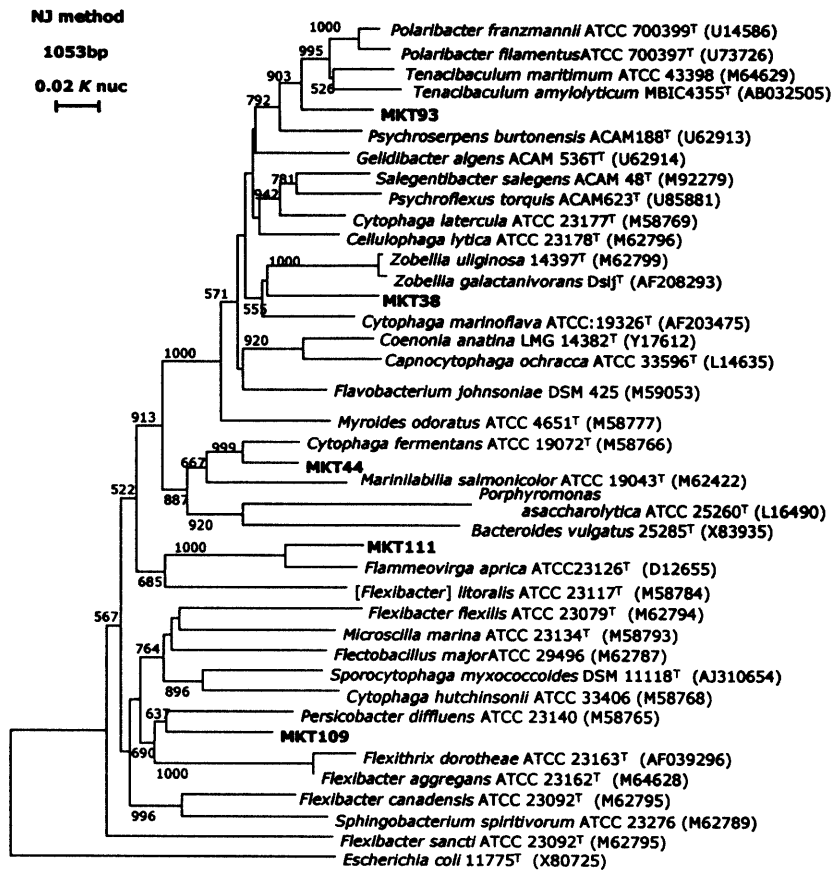


Fig.3