

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 15 年度博士課程入学

氏 名 細谷 祥一

指導教員 横田 明

論文題目 *Proteobacteria* 門および *Bacteroidetes* 門に属する海洋細菌の系統分類に関する研究

はじめに

地球は水の惑星といわれるようにその表面積の約 70%を海洋でおおわれており、そこには多種多様な生物が生息している。これまで、海洋の生物資源というと、漁獲対象の大型生物が着目され、微生物にはあまり関心が持たれなかった。近年、環境問題が盛んに取り上げられ、海洋環境の生物活動とその物質循環が重要視されており、中でも細菌は潜在的に大きな役割を担っていると考えられている。細菌は主に分解者とされ、特に掃除屋 (scavenger) として認知されてきているが、生理活性物質の生産者としても注目されており、海洋細菌を新規に分離することは学術的に有意義なだけでなく、未知の生物資源の確保および新規生理活性物質の発見も期待できる。

海洋細菌とは一般的に海洋より分離された細菌の総称であり、その性質として 2-5%の塩濃度に対しての耐性あるいは好塩性を持つことが知られている。海洋細菌の先行研究は非常に多く、これまでに多くの海洋細菌が同定されている。特に *Proteobacteria* 門の *Gammaproteobacteria* 綱に属する細菌が多くを占めている。本研究は第一に、この *Gammaproteobacteria* 綱以外の *Alphaproteobacteria* 綱や *Betaproteobacteria* 綱および *Bacteroidetes* 門に特異的に設計された

16S rRNA 遺伝子プライマーを使った Signature-PCR でのスクリーニングを行い、これらの分類群に属する海洋細菌を選択分離し、新規細菌を取得することを目的とした。第二に、タイ国の海洋環境から得られた新規滑走運動性海洋細菌 4 株 (No.24 株、No.62 株、No.71 株および 59SA 株) について、菌体脂肪酸分析よりアラキドン酸が検出されたことから、その分類学的位置を明らかにすることを目的とした。

Signature-PCR による海洋細菌の選択分離と系統分類に関する研究

日本国内沿岸の7か所の地域(北海道斜里町ウトロ、岩手県宮古市真崎、新潟県山北町笹川流れ、千葉県鴨川市吉浦、同県南房総市野島崎、東京都八丈島、静岡県下田市)で海水を採水し、6種類の平板培地に塗布して一週間培養後、菌株を分離した。分離株について、特異的プライマーによる Signature-PCR を行った。*Alphaproteobacteria* 綱や *Betaproteobacteria* 綱、*Bacteroidetes* 門の既知種菌株と比較し、泳動パターン的一致する分離株のスクリーニングを行った。

これまでに総数 419 の菌株を分離した。Signature-PCR の結果、*Alphaproteobacteria* に属する分離株 16 株、*Bacteroidetes* 門に属する分離株 27 株を選択分離した。これら分離株の 16S rRNA 遺伝子塩基配列による系統解析を行ったところ、*Alphaproteobacteria* 綱に属する分離株は、*Brevundimonas* 属、*Erythrobacter* 属、*Hoeflea* 属、*Loktanella* 属、*Mesorhizobium* 属、*Novosphingobium* 属、*Paracoccus* 属、*Pseudovibrio* 属、*Sulfitobacter* 属、*Staleyia* 属に近縁であった。また、*Bacteroidetes* 門に属する分離株はほぼ *Flavobacteriaceae* 科に属し、*Algibacter* 属、*Cellulophaga* 属、*Croceibacter* 属、*Flavobacterium* 属、*Gramella* 属、*Krokinobacter* 属、*Lutibacter* 属、*Maribacter* 属、*Olleya* 属、*Sediminicola* 属、*Tenacibaculum* 属、*Zobellia* 属に近縁であった。また、”*Flammeovirgaceae*”科に属し、*Flammeovirga* 属に近縁な菌株も得られた。

Alphaproteobacteria 綱に属し、*Erythrobacter* 属、*Loktanella* 属、*Novosphingobium* 属、*Paracoccus* 属、*Pseudovibrio* 属、*Sulfitobacter* 属、*Staleyia* 属に属する分離株、*Bacteroidetes* 門に属し、*Flavobacterium* 属、*Gramella* 属、*Tenacibaculum* 属、*Flammeovirga* 属に属する分離株は近縁既知種との DNA 相同性試験の結果、新種であると示唆された。*Pseudovibrio* 属に属する分離株 WSF2、*Loktanella* 属に属する分離株 IG8 並びに *Flammeovirga* 属に属する分離株 YS10、YML5 については同定試験を終了した。これらの分離株を既知の種とは異なる新種であると同定し、WSF2 株を基準株とする *Pseudovibrio japonica* sp. nov.、IG8 株を基準株とする *Loktanella atroaurantiaca* sp. nov.並びに YS10 株を基準株とする *Flammeovirga kamogawanensis* sp. nov.

を提唱した。

さらに”*Flammeovirgaceae*”科に属する *Flexithrix dorotheae* と *Flexibacter aggregans* について分類学的検討を行った。16S rRNA 遺伝子塩基配列が一致すること、DNA 相同性試験で 70%以上の高い値を示したこと、生理・生化学試験において差異が認められなかったことから同種と判断し、*Flexibacter aggregans* を *Flexithrix dorotheae* のシノニムとした。

アラキドン酸高度産性能を有する海洋細菌の分類学的研究

タイ国産、滑走運動性海洋細菌 4 株 (No.24 株、No.62 株、No.71 株および 59SA 株) について分類学的検討を行った。16S rRNA 遺伝子塩基配列による系統解析から、これらの株は *Bacteroidetes* 門に属し、*Saprospira* 属に近縁な新属であると推定された。また No.24 株、No.62 株、No.71 株同士は 16S rRNA 遺伝子塩基配列がほぼ 100%の相同値であり、DNA 相同性試験の結果、同種と示唆された。59SA 株とこれら 3 株とでは 16S rRNA 遺伝子塩基配列の相同値は 94%、No.24 株との DNA 相同性試験を行ったところ 5%未満の低い数値であり、別種であると示唆された。さらに *Saprospira* 属の基準種である *S. grandis* のデータを参照し、生理・生化学試験を行った。

4 菌株の菌体脂肪酸組成を分析したところ、一般的に動物のみが持つとされる高度不飽和脂肪酸 20:4 (アラキドン酸) を主成分とする、珍しい特徴を持つことが分かった。これまでにアラキドン酸を産生する菌について *Deltaproteobacteria* に属する *Plesiocystis pacifica*、*Bacteroidetes* 門に属する *Psychroflexus torquis*、*Krokinobacter* 属の 2 種 (*K. eikastus* と *K. diaphorus*)、*Flammeovirga* 属の 3 種 (*F. aprica*、*F. arenaria* および *F. yaeyamensis*) が報告されている。これら 7 種のうち *F. aprica* の 24.2% が最も高い値であったが、それに対し 4 菌株は約 40% という高い組成比を示し、特異な菌であると考えられた。また近縁の *Saprospira grandis* NCIMB 1363^T の主要脂肪酸は iso-15:0、iso-17:0 3OH であり、脂肪酸組成が大きく異なっていた。

タイ国産の滑走運動性海洋細菌 3 株 (No.24 株、No.62 株および No.71 株) を既知の属とは異なる新属新種であると同定し、No.24 株を基準株とする *Aureispira marina* gen. nov., sp. nov. を提唱した。また、59SA 株を基準株とする *Aureispira maritima* sp. nov. を提唱した。

まとめ

本研究では Signature-PCR によって日本国内の沿岸の海水から *Alphaproteobacteria* 綱に属する分離株および *Bacteroidetes* 門に属する分離株を効果的に選択分離することができた。

Alphaproteobacteria 綱に属する 2 新種 *Pseudovibrio japonica*、*Loktanella atroaurantiaca*、*Bacteroidetes* 門に属する 1 新種 *Flammeovirga kamogawanensis* を提唱した。また”*Flammeovirgaceae*”科に属する *Flexithrix dorotheae* と *Flexibacter aggregans* について、*Flexibacter aggregans* が *Flexithrix dorotheae* のシノニムであることを明らかにした。

タイ国産の滑走運動性海洋細菌 4 株について、*Bacteroidetes* 門に属する 1 新属 *Aureispira*、本属に属する 2 新種 *Aureispira marina*、*Aureispira maritima* を提唱した。*Aureispira* 属 2 新種は菌体脂肪酸としてアラキドン酸を極めて多く含有することから、産業面での応用が期待できる。