

論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻
平成 18 年度博士課程 入学
氏 名 福永 幸代
指導教員名 横田 明

論文題目

海棲無脊椎動物および海藻に共在する新規系統群細菌の分離とその系統分類学的研究

はじめに

地球上の生物多様性の大多数を構成しているのは微生物であり、微生物が多様な遺伝子をもつ遺伝資源の宝庫であることは指摘されて久しい。しかし、培養されている微生物は自然界の微生物多様性の中の極めて小さな部分でしかない。本研究では、新規系統群の細菌を分離、培養し、その分類学的性質を解析することを目的とする。今まで知られていない、新たな分類群の菌株を分離することは、細菌の進化を知る手がかりとなり、塩基配列だけで知られていた系統群が実際に存在することを明らかにし、新たな遺伝子資源と出会うことである。培養を経ずに細菌の多様性を直接解析する研究がなされるようになると、環境中には未だ培養されていない phylum レベルの系統群が多数存在するということがわかってきた。既知の系統群と系統的に大きくはなれたグループは、今まで知られていなかった未知の機能、代謝経路を持っている可能性が高い。本研究では、より新規性の高い細菌を分離するため、これまであまり探索の対象とされていなかった海棲無脊椎動物と海藻の、体内および表面を分離源とし、細菌の分離及びその系統分類を行う。

海水中の細菌叢と海藻に共在する細菌叢の比較

海棲生物の体表も分離源として用いるにあたり、海棲生物に共在する細菌叢とその周囲を満たしている海水に存在する細菌叢に違いがあるのかを調べた。海水中の細菌叢と海水中に棲息している生物に共在する細菌叢を比較した。海水および海藻を試料とし、培養された菌株を調べる培養法、および試料から抽出した DNA で作成した 16S rRNA 遺伝子のクローンライブラリ

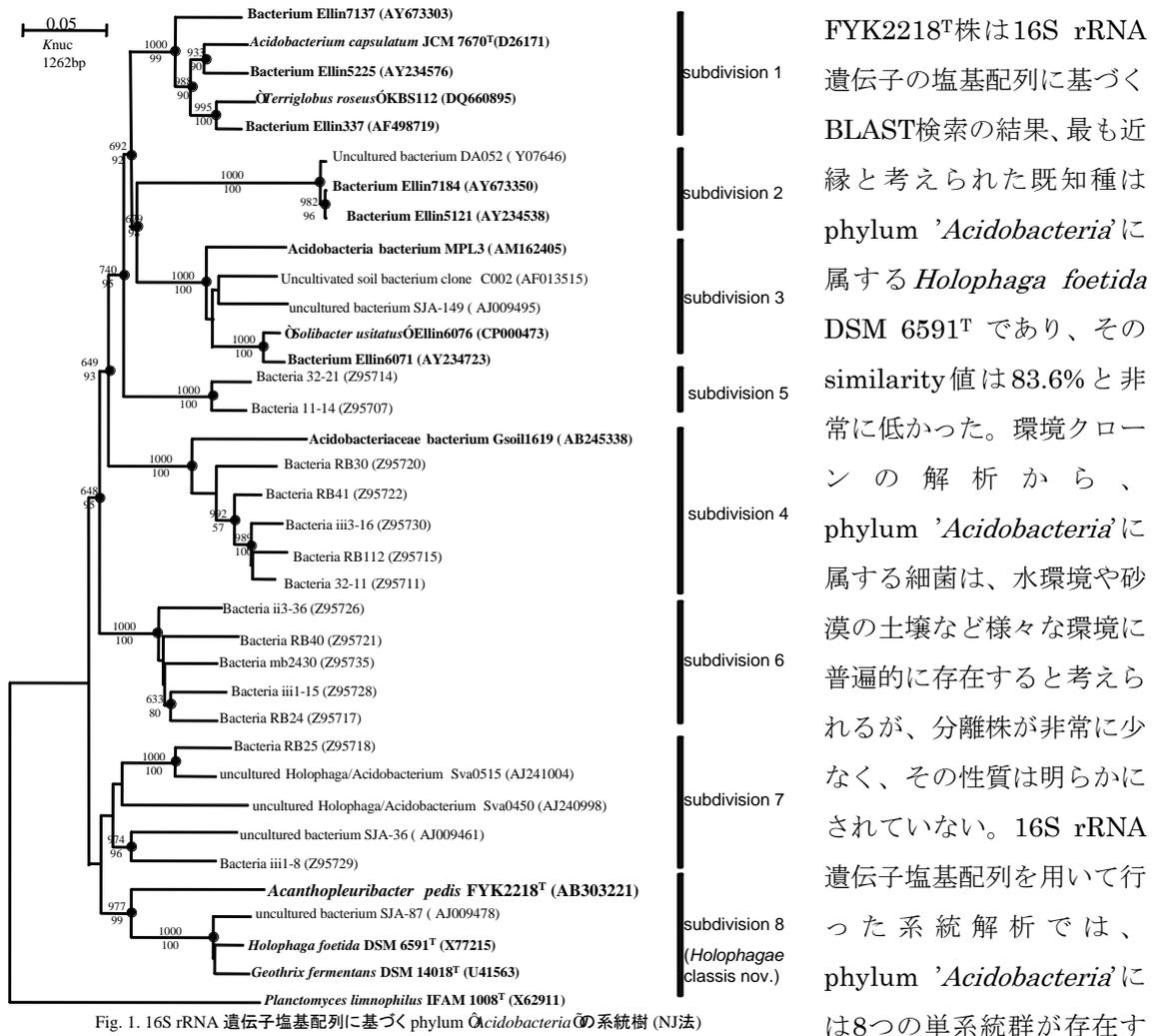
一を用いた培養によらない方法で、試料中に共在する細菌の分類学的構成を調べた。培養法でも、培養によらない環境 DNA を用いた方法でも、海水中に含まれる細菌叢と、そこに生育していた海藻に共在する細菌叢は異なっており、培養法、非培養法それぞれに特有の系統群がみられた。

無脊椎動物および海藻からの微生物の分離と分類学的特徴

32 の生物試料と 1 つの海水試料から、低栄養培地を用いた長期間・光照射下培養により、1,182 株、8 つの phylum にわたる多様な分類群の細菌を分離した。分離株の 16S rRNA 遺伝子塩基配列を解析したところ、分離株のうち 472 株が新種など、新規な系統群の菌株であると考えられた。高次分類群である family, order, class のレベルで新規な系統を形成する菌株を 20 グループ発見した。

Phylum 'Acidobacteria' に属する新規性の高い分離株の分類学的研究

千葉県勝浦市で採取したヒザラガイ (*Acanthopleura japonica*) の足板から分離された



FYK2218^T株は 16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく BLAST 検索の結果、最も近縁と考えられた既知種は phylum 'Acidobacteria' に属する *Holophaga foetida* DSM 6591^T であり、その similarity 値は 83.6% と非常に低かった。環境クローンの解析から、phylum 'Acidobacteria' に属する細菌は、水環境や砂漠の土壌など様々な環境に普遍的に存在すると考えられるが、分離株が非常に少なく、その性質は明らかにされていない。16S rRNA 遺伝子塩基配列を用いて行った系統解析では、phylum 'Acidobacteria' には 8 つの単系統群が存在す

ることが指摘されている¹⁾。NJ法、MP法およびML法を用いて16S rRNA遺伝子塩基配列に基づく系統樹を作成したところ、FYK2218^Tを含むsubdivision 8は 高いブーツストラップ値で支持されたことから、subdivision 8をclass *Holophagae classis nov.*として提案する(Fig. 1)。また、FYK2218^Tは近縁種との表現形質の違いおよび系統樹から、新種新属*Acanthopleuribacter pedis* gen. nov., sp. novとして提案すると同時に、FYK2218^Tとsubdivision 8の他のメンバーとの16S rRNA遺伝子塩基配列のsimilarityが非常に低い (82.7-83.6%)ことから、*Acanthopleuribacter* をtype genusとして*Acanthopleuribacteraceae* fam. nov.と*Acanthopleuribacterales* ord. nov.として提案する。さらに、*Holophaga*をtype genusとして、*Holophagales* ord. nov.とfamily *Holophagaceae* fam. nov. を提案する。

Phylum 'Planctomycetes'に属する新規性の高い分離株の分類学的研究

東京都御蔵島海岸で採取したアマノリ的一种 (*Porphyra* sp.)からFYK2301M01, FYK2301M18, FYK2301M52を分離した。分離株FYK2301M01, FYK2301M18, FYK2301M52の16S rRNA遺伝子塩基配列によるBLAST検索の結果、最も近縁と考えられた既知種は*Planctomyces brasiliensis* DSM 5305^Tであり、similarity値は78.7%と極めて低かった。これら3株のコロニーは円形でルビーレッドであり、メタノール抽出液にはカロテノイド様の吸収スペクトルがみられた。細胞の超薄切片をTEMで観察したところ、細胞内部に内膜様の構造がみられ、細胞は2分裂によって増殖すると考えられた。分離株FYK2301M01, FYK2301M18, FYK2301M52と、phylum 'Planctomycetes'の姉妹群と考えられるphylum、'Verrucomicrobia', *Chlamydiae*, *Lentisphaerae*とともに系統解析を行った結果、分離株FYK2301M01, FYK2301M18, FYK2301M52はphylum 'Planctomycetes'に属することが明らかになった。環境クローンの解析によれば、phylum 'Planctomycetes'のメンバーは多様な水環境および陸上環境に偏在していると考えられており、また、既知種は全て出芽によって増殖し、細胞内に内膜様構造を持つことが知られている。環境クローンを含めた16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく系統解析の結果、phylum 'Planctomycetes'には (1)記載種が存在するグループ、class *Planctomycea*, (2)クローンの配列のみで形成されるグループ、WPS-1²⁾ (3) Anammox活性をもつ細菌が含まれる、純粋培養された株がないAnammox細菌グループ、の少なくとも3つのグループに分かれ、それぞれがclassレベルの系統群である可能性が指摘されている³⁾。NJ法およびML法で系統樹を作成したところ、分離株FYK2301M01, FYK2301M18, FYK2301M52はWPS-1 groupに含まれることが示唆された (Fig. 2)。WPS-1に属する環境クローンおよび分離株と、近接したクレード (1) class *Planctomycea* と (3) Anammox細菌グループとの16S rRNA遺伝子塩基配列のsimilarityは70.1-79.8%であった。これらのことから、WPS-1 groupは新しいclassとして定義されるべきであると考えられ、*Phycisphaerae* classis nov.として提案する。また、Phylum 'Planctomycetes'の既知種との比較、および系統樹から、分離株FYK2301M01, FYK2301M 18, FYK2301M 52はphylum 'Planctomycetes'に含まれる新属新種であると考えられ、*Phycisphaera mikurensis*

gen. nov., sp. nov.として提案する。

まとめ

分離源および分離方法を工夫することにより、これまで分離例がなく、遺伝子の配列のみでしか知られていなかった大きなグループから細菌を分離することに成功し、その系統的位置および分類学的性状を明らかにした。

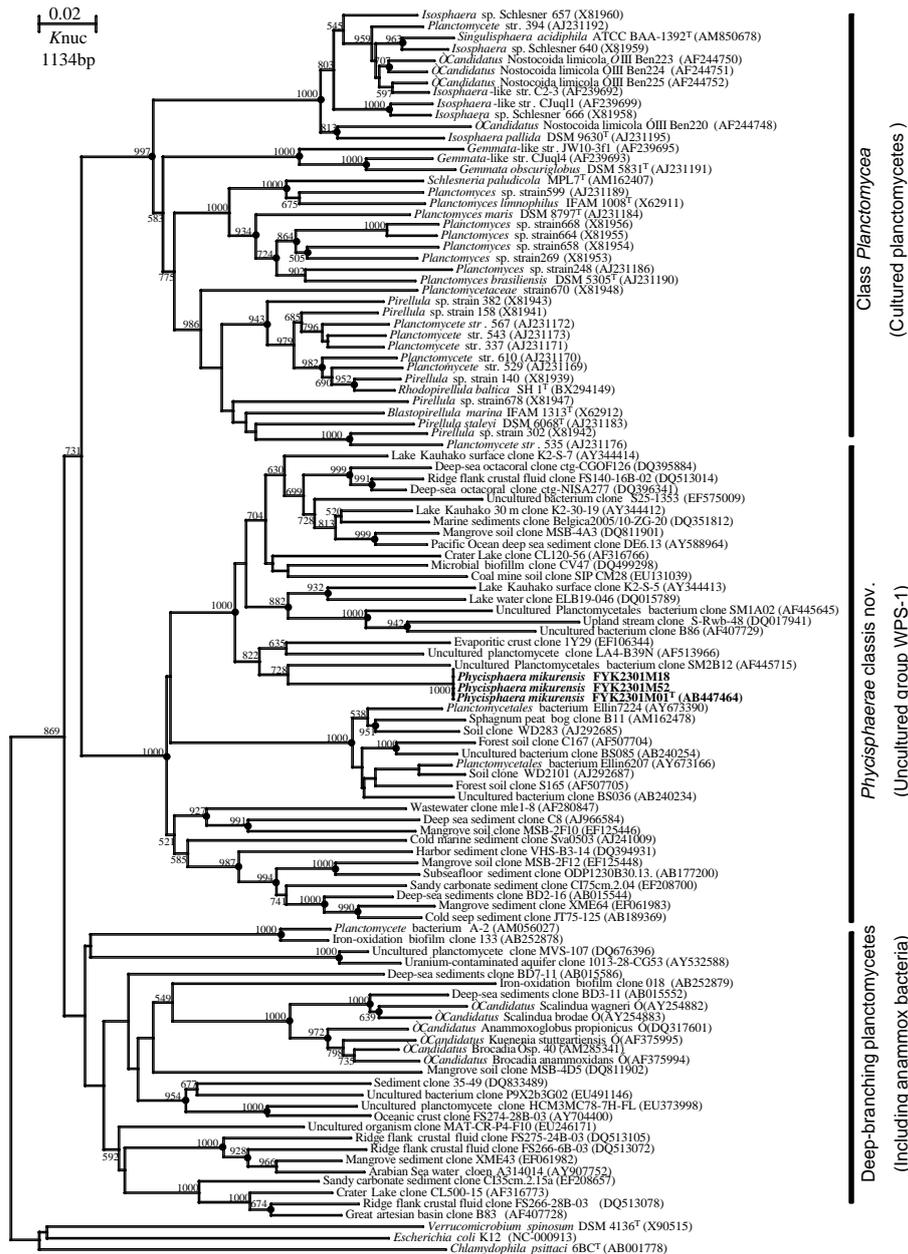


Fig. 2. 16S rDNA 遺伝子塩基配列に基づく phylum Planctomycetes の系統樹 (NJ法)

References

- 1) Hugenholtz *et al.*, (1998). *J. Bacteriol.* 180: 4765
- 2) Nogales *et al.*, (2001). *Appl Environ Microbiol.* 67: 1874
- 3) Janssen (2006). *Appl Environ Microbiol.* 72: 1719