

海洋性発光細菌 *Photobacterium leiognathi* における発光遺伝子の系統解析

2007年3月 自然環境学専攻 56707 内山奈美

指導教員 木暮一啓 教授

キーワード：発光細菌, *Photobacterium leiognathi*, *lux* 遺伝子, 系統解析, 遺伝子進化

I. はじめに

発光細菌は、現在確認されている4属19種の内、3属16種が海洋性であり、沿岸から外洋の海水や海底泥、海産動物の体表や腸管、特定の魚類、イカ類の共生発光器内などから分離される。発光細菌は発光酵素(ルシフェラーゼ)の働きにより、長鎖アルデヒドとFMNH₂が酸化されることによって波長約490nmの光を放つ。この反応に関わる遺伝子はゲノム上に発光遺伝子群(*lux*オペロン)として集約している。*lux*オペロンは、ルシフェラーゼをコードする*luxA*, *B*, 脂肪酸還元酵素系をコードする*luxC*, *D*, *E*から成る。共生発光細菌は宿主の発光器内に純粋培養されており、水平感染によって次世代の宿主へ伝搬される。発光細菌とイカの共生関係は、細菌の未感染宿主への付着、発光器内での増殖と定着を経て成立し¹⁾、*luxA*遺伝子は、共生の維持に不可欠であることが示されている²⁾。

本研究で対象とした*Photobacterium leiognathi*は、多様な宿主(ヒイラギ科、テンジクダイ科、ホタルジャコ科、ヤリイカ科)に共生するとともに、海洋環境中にも普遍的に存在する発光細菌の一種である。*luxA*に基づく系統解析から、*P. leiognathi*には2系統あり³⁾、ヒイラギの発光器由来株を含む系統群は*P. leiognathi* subsp. *leiognathi* (L型)、それ以外の宿主由来の株を含む系統群は*P. leiognathi* subsp. *mandapamensis* (M型)であることが示された⁴⁾。しかし、「特定宿主に共生する株だけでなく、海洋環境中にあまねく分布する*P. leiognathi*集団がどの系統に属するのか?」、「*P. leiognathi*にはこれまで知られている2系統以外の系統があるのか?」、「*P. leiognathi*の系統的な多様性はどのように形成、維持されているのか?」などは未解明である。本研究は、これらの問いに答え、*P. leiognathi*の系統進化の解明を目指して、沿岸および外洋の海水、共生宿主魚類やイカ類、それ以外の海産魚類の体表や腸内など様々な海洋試料から分離した141株の*P. leiognathi*について、*luxA*遺伝子配列を系統解析した。その中から選んだ21株については全*lux*遺伝子配列の系統解析も実施した。

II. 材料と方法

1/2 Zobell 寒天培地で分離した*P. leiognathi*のうち、海水由来株70、海洋動物付着株16、共生株55、計141株を用いた。培養菌体から抽出したゲノムDNAを鋳型として*luxA*遺伝子をPCR増幅し、得られたPCR産物を精製後、dye-termination法により塩基配列を決定した。*LuxA*の系統解析結果に基づいて21の代表株を選び、他の*lux*遺伝子についても系統解析を行うとともに、Zobell液体培地中の増殖と発光強度を測定した。

III. 結果および考察

得られた*P. leiognathi*141株の*luxA*配列はいずれも、これまでに知られている*luxA*の2系統、LもしくはM型に属したことから、*P. leiognathi*の*luxA*にはL、M以外の新

たな系統が存在する可能性は低いと考えられる。また *luxA* とともにルシフェラーゼをコードする *luxB*、発光基質の再生に必要な脂肪酸還元酵素遺伝子群 *luxC*、*luxD*、および *luxE* についても系統解析を行った結果、*luxA* の場合とほぼ同様の 2 系統に分化することがわかった。このことから、発光反応に関わる *lux* オペロン全体が祖先型から 2 系統に分化し、変異を蓄積してきたと考えられる。

東京湾や浜名湖など陸に近い沿岸海水から分離された *P. leiognathi* のほとんどは L 型であり、反対に太平洋赤道域の海水から分離されたものはすべて M 型の *P. leiognathi* で占められた。相模湾の海水からは、L 型および M 型 *P. leiognathi* が同程度分離され、サバやイワシ、カタクチイワシ、シイラ等の腸内からも L 型および M 型 *P. leiognathi* が分離された。海域ごとに異なる分布を生じる要因として、各 *P. leiognathi* の共生および寄生宿主の分布や生態の違いが考えられる。ヒイラギは毎日 10^6 細胞以上の共生 *P. leiognathi* を海水中に排出し得るので⁵⁾、ヒイラギ科魚類が常在する内湾域には L 型 *P. leiognathi* が絶えず供給されることが考えられる。一方、M 型共生宿主は、サンゴ礁域に生息するヒカリイシモチ、亜熱帯から温帯域の沖合に生息するホタルジャコやケンサキイカなどであり、ヒイラギ科魚類よりも広範囲の海洋環境に分布している。これらの宿主が M 型の共生 *P. leiognathi* を海水中に定期的に排出するならば、M 型 *P. leiognathi* は L 型よりも広い分布を示すと考えられる。*P. leiognathi* が非特異的に付着している海産動物も、この細菌の分布パターン形成に寄与すると考えられる。

以上、本研究により、海産動物との特異的な共生関係ならびに非特異的な寄生関係が、海洋における *P. leiognathi* の分布拡大および遺伝的分化を促進してきたと考えられる。

IV. 引用文献

- 1: Nyholm and McFall-Ngai (2004) Nature Rev Microb. 2:632-642.
- 2: Visick *et al.* (2000) J Bacteriol 182: 4578-86.
- 3: Ast and Dunlap (2004) Arch Microbiol 181: 352-361.
- 4: Wada *et al.* (2006) FEMS Microbiol Lett 260: 186-192.
- 5: Wada *et al.* (2005) Bioluminescence and Chemiluminescence p.99-102.

Molecular phylogenetic analysis of the luminescent genes of marine bioluminescent bacterium *Photobacterium leiognathi*

Mar. 2007, Department of Nature Environmental Studies, 56707 UCHIYAMA, Nami

Supervisor; Professor, Kazuhiro KOGURE

Keywords; bioluminescent bacteria, *Photobacterium leiognathi*, *lux* gene, phylogenetic analysis, evolution

I. Introduction

Bioluminescent bacteria are ubiquitous in marine environments and often isolated from seawater, particulate matter and body surface or digestive tract of marine animals. Some are also found as the light organ symbionts in certain species of fish and squid. Bacterial bioluminescence is produced by an enzyme (luciferase)-catalyzed oxidation of a long-chain aldehyde and FMNH₂. A set of genes, known as *luxC*, *D*, *A*, *B* and *E*, is responsible for the bioluminescence; *luxA* and *B* for the luciferase, whereas *luxC*, *D* and *E* for the fatty acid reductase. In the light organ symbiosis, bacterial colony is maintained extra-cellularly in the light organ and horizontally transferred to the host offspring¹⁾. The *luxA* was found to be essential for the persistence of the colonized bacteria in the light organ.²⁾

In the present study, I focused on *Photobacterium leiognathi* that is commonly distributed in marine environments as free-living or gut associated forms, and is capable of establishing light organ symbiosis with diverse fish (leiognathid, acropomatid and apogonid) and squid (loligo). Recent studies on the *luxA* gene phylogeny revealed that *P. leiognathi* is comprised of two genetically distinct populations, proposing that *P. leiognathi* isolates from leiognathid fish are designated as *P. leiognathi* subsp. *leiognathi* (L type), while the ones from different hosts are *P. leiognathi* subsp. *mandapamensis* (M type)^{3,4)}. In order to clarify the phylogenetic relationships among *P. leiognathi* populations, I conducted phylogenetic analyses of the *luxA* gene sequences of 141 *P. leiognathi* isolates derived from various marine samples. I further analyzed the entire sequences of the *luxCDABE* on 21 representative isolates and discussed possible mechanisms by which diversity of *P. leiognathi* is formed and maintained in marine environments.

II. Materials and Methods

P. leiognathi were isolated using 1/2 Zobell agar from the symbiotic light organs (leiognathid, acropomatid and apogonid fish, and loligo squid), surface and intestine of non-symbiotic fishes, and seawater. PCR amplification of the *lux* genes was conducted with genomic DNA from the isolates and the PCR products were sequenced. Phylogenetic analyses of the gene sequences were performed by MEGA3.1. The light intensity and growth of the isolates were measured in Zobell broth.

III. Result and Discussion

Phylogenetic analysis of the *luxA* from 141 *P. leiognathi* isolates generated two distinct clades; one was consisted of L type isolates and the other consisted of M type isolates. As the phylogenetic

relationships of other *lux* genes (*luxC*, D, B and E) among the representative isolates were the same as those of the *luxA* genes, it is very much likely that an ancestral *lux* genes of *P. leiognathi* has diverged into L and M type, and each of the *lux* genes has accumulated genetic variation.

Above 80% of the *P. leiognathi* isolates from the coastal area (Tokyo-Bay and Lake Hamana) belonged to L type, while all the pelagic isolates of *P. leiognathi* were M type. *P. leiognathi* isolates from Sagami-Bay were almost evenly divided into L and M type. Both L and M type *P. leiognathi* were also isolated frequently from the gut of non-symbiotic fish. It is likely that these diversity patterns of *P. leiognathi* in marine environments are strongly affected by the distribution and ecology of the host organisms of *P. leiognathi*. As one leiognathid fish can expel 10^6 cells of symbiotic *P. leiognathi* into surrounding water per day⁵⁾ coastal area in which dense population of leiognathid fish inhabits can be dominated by L type *P. leiognathi*. On the other hand, symbiotic hosts of M type *P. leiognathi* (acropomatid and apogonid fish, and loligo squid) inhabit not only coastal but also pelagic region. Thus, if these hosts are also capable of expelling symbiotic cells into surroundings, M type *P. leiognathi* can be distributed in wider regions of the ocean compared with L type. Non-symbiotic hosts harboring *P. leiognathi* is also likely to play roles in determining the bacterial distribution.

In conclusion, the present study indicates that both symbiotic and non-symbiotic interaction with marine animals has driven the evolution and radiation of a marine bioluminescent bacterium, *P. leiognathi* in the ocean.

IV. Reference

- 1: Nyholm and McFall-Ngai 2004. Nature Rev. Microb. 2: 632-642.
- 2: Ast and Dunlap 2004. Arch Microbiol 181: 352-361.
- 3: Visick et al. 2000. J Bacteriol 182: 4578-86.
- 4: Wada et al. 2005. Bioluminescence and Chemiluminescence pp.99-102.
- 5: Wada et al. 2006. FEMS Microb. Lett. 260: 186-192.